

825 325

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ



5903612080

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
CENTRO GENERAL
SECCIÓN DE

30 MAR 2004

RECIBIDA SALIDA
Nº 825 Nº

**ESTUDIOS ESTRUCTURA-FUNCIÓN SOBRE LA
ENZIMA ARIL-ALCOHOL OXIDASA
IMPLICADA EN LA BIODEGRADACIÓN DE LA LIGNINA**

Patricia Ferreira Neila



C-3612080



CSIC

TESIS DOCTORAL

Universidad de Alcalá
Facultad de Ciencias

2004



Universidad
de Alcalá

Portada: Canal de acceso de sustratos (en este caso una molécula de alcohol veratrílico en rojo) hasta el cofactor (FAD en amarillo) en el modelo molecular de la AAO de *P. eryngii* (1QJN).

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR Y TUTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

(Art. 8º 1 del R.D. 778/98)

Los Dres. Ángel T. Martínez Ferrer y Juan Soliveri de Carranza, como Director y Tutor respectivamente de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIOS ESTRUCTURA-FUNCIÓN SOBRE LA ENZIMA ARIL-ALCOHOL OXIDASA IMPLICADA EN LA BIODEGRADACIÓN DE LA LIGNINA", realizada por Patricia Ferreira Neila en el Departamento de Microbiología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas, adscrita al programa de doctorado de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá, autorizan su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización en Alcalá de Henares a 31 de Marzo de 2004.

Fdo: Dr Ángel T. Martínez

Fdo: Dr Juan Soliveri

**Juan Soliveri de Carranza, Profesor Titular de Microbiología
y Director del Departamento de Microbiología y
Parasitología de la Universidad de Alcalá**

CERTIFICA:

Que Doña Patricia Ferreira Neila, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas, bajo la dirección del Doctor Ángel T. Martínez, el trabajo titulado: "ESTUDIOS ESTRUCTURA-FUNCIÓN SOBRE LA ENZIMA ARIL-ALCOHOL OXIDASA IMPLICADA EN LA BIODEGRADACIÓN DE LA LIGNINA", que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares a 31 de Marzo de 2004.



Fdo: Dr. Juan Soliveri

A mis padres

*“Es mejor saber después de haber pensado y discutido
que aceptar los saberes que nadie discute para no tener
que pensar”*

Fernando Savater

El presente trabajo, desarrollado en el Centro de Investigaciones Biológicas en Madrid y en dos estancias en los departamentos de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza y de Bioquímica de la Universidad de Wageningen, ha sido financiado por una beca del programa FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología en el marco de los proyectos BIO1999-908 y BIO2002-1166 del Programa Nacional de Biotecnología.

Son muchas las personas que durante estos años, de una u otra manera, han participado en la realización de esta tesis, y a todas ellas quisiera expresar en estas líneas mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Ángel T. Martínez, director de este trabajo. Formar parte de su grupo ha sido muy enriquecedor profesionalmente. Gracias por su dedicación y esfuerzo, en especial en esta última y difícil etapa de la escritura.

A la Dra. María Jesús Martínez por su cariñosa acogida a mi llegada al laboratorio haciéndome más sencillo lo que siempre resulta más difícil: el comienzo.

Al Dr. Juan Soliveri de Carranza, tutor de esta Tesis en la Universidad de Alcalá, por su buena disposición siempre que he requerido su ayuda.

A todos mis compañeros de laboratorio, Susana, Olga, Víctor, David, Maria, Ana, Elvira, por su auxilio y apoyo en el día a día del laboratorio y por nuestras divertidas salidas fuera del CIB. A Javi por su ayuda con las técnicas de Biología Molecular. A Paco por poner a mi disposición sus conocimientos sobre la aril-alcohol oxidasa y nunca ser "tacaño" con su tiempo. A Marta y Mariela por vuestro apoyo, los gratos momentos compartidos y otros muchos que espero queden por venir. A Atef por los bonitos lugares y recuerdos. A Quique porque es una suerte tener un colega como tu (que no amigo): gracias por tu buena disposición y las interesantes charlas y discusiones. A Isabel: tu amistad me refresca y enriquece; juntas hemos pasado momentos muy divertidos, gracias por tu autenticidad. A los técnicos de laboratorio, Angelines, Maria José y Teresa, por los ratos compartidos.

Al Dr. Willen van Berkel por sus interesantes charlas sobre flavoproteínas durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Carlos Gómez Moreno y todo su grupo de trabajo, Susana, Marta, Isabel, Jesús y Guillermina, por su simpatía y ayuda durante mi estancia en la Universidad de Zaragoza. En especial, a la Dra Milagros Mediana por su dirección y continua ayuda con las cinéticas rápidas, así como por su amabilidad y agradable trato. Gracias por la confianza puesta en mí para futuros proyectos.

A todo el departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá: Dra. Juana Rodríguez, Dr. Manuel Hernández y los profesores Fco. Javier Mérida y Begoña Fernández. Mi periodo en Micro fue muy enriquecedor profesional y personalmente. Al Dr. José Luis Copatino por quien estoy en el CIB. No pude tener mejor comienzo que contigo; gracias por todo lo que me enseñaste durante mis años en la Universidad y por tu continuo apoyo. A la Dra. Enriqueta Arias por la que siempre he sentido admiración. A la Dra. Maria Isabel Pérez-Leblic por tu amistad, me encanta poder contar contigo. A mis antiguos compañeros de Micro: Maria, Nardy, Amarilis, Yolanda y Oscar por el tiempo que pasamos juntos.

A mis amigas de siempre, que últimamente he tenido algo abandonadas, en especial a Gema y Nardy con las que he disfrutado de momentos inolvidables. Gema, gracias por haber aguantado estoicamente las "aburridas charlas" de laboratorio, por estar siempre ahí en lo bueno y en lo malo. Nardy, la hermana mayor que nunca tuve; conocerte ha sido una de las mejores cosas que me han pasado, gracias por ayudarme a superar mis propios obstáculos.

A mi familia, los pilares sobre los que me asiento. A mis tías, Beatriz y Maria Victoria, porque sois como una segunda madre y es una fortuna contar con vuestro cariño. A mis hermanos, David y Salud, que me quieren y sufren como hermana y forman parte de todos mis proyectos. A mis padres, Isabel y Patricio, porque viven volcados en sus hijos, sin vuestro apoyo y ayuda este trabajo no hubiese sido posible, gracias por vuestro cariño.

Abreviaturas

A	alanina
AAO	aril-alcohol oxidasa salvaje
AAO*	aril-alcohol oxidasa recombinante
AAD	aril-aldehído deshidrogenasa
BSA	seroalbúmina de suero bovino
C	cisteína (aminoácido); citosina (nucleótico)
D	aspartato
DTT	ditiotreitol
E	glutamato
E _{ox}	enzima oxidada
E _{red}	enzima reducida
E _{red} ~I	complejo enzima reducida-intermediario y/o producto
EDTA	tetracetato de etilendiamino (<i>Ethylenediamine Tetracetate</i>)
E-FAD	flavoenzima
ϵ	coeficiente de extinción molar
F	fenilalanina
FAD	flavín-adenín dinucleótido
FMN	flavín-adenín mononucleótido
G	glicina (aminoácido); guanina (nucleótido); guayacilpropano (unidad de lignina)
GMC	familia de oxidorreductasas (glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, metanol oxidasa y colina deshidrogenasa)
H	histidina; 4-hidroxifenilpropano (unidad de lignina)
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
I	isoleucina
IPTG	isopropil tio- β -D-galactósido
K	lisina
L	leucina
LiP	lignina peroxidasa
M	metionina
MALDI-TOF	tiempo de vuelo tras desorción e ionización por láser asistida por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization-Time Of Flight</i>)
MnP	manganeso peroxidasa
N	asparagina

^{19}F NMR	resonancia magnética nuclear de fluor (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
P	prolina; producto
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	base de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PEG	polietilenglicol
Q	glutamina
R	arginina
rpm	revoluciones por minuto
S	serina, sustrato; siringilpropano (unidad de lignina)
SDS	dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
T	treonina (aminoácido); timina (nucleótido)
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletildiamina
V	valina
VP	peroxidasa versátil
W	triptófano
Y	tirosina

Resumen

La biodegradación de la lignina es un proceso oxidativo, llevado a cabo por los denominados hongos de podredumbre blanca. El peróxido de hidrogeno tiene un importante papel en este proceso como precursor del radical libre hidroxilo y co-sustrato de peroxidasas ligninolíticas. La aril-alcohol oxidasa (AAO) de *Pleurotus eryngii* es una flavoproteína extracelular que genera H_2O_2 en la reacción de oxidación de la enzima por el O_2 , mientras que su reducción da lugar a reacciones de deshidrogenación oxidativa de diferentes alcoholes aromáticos. Esta glicoproteína es un monómero que contiene como cofactor una molécula de FAD. Su reciente clonación ha permitido la expresión heteróloga en *Emericella nidulans* y *Escherichia coli*. Este hecho, unido a las similares propiedades catalíticas de las enzimas recombinantes y salvaje (de *P. eryngii*), ha permitido completar la caracterización fisicoquímica, cinética y estructural de la AAO que constituye el objetivo de este trabajo.

La caracterización espectrofotométrica reveló que la AAO es un oxidasa poco común, ya que no estabiliza termodinámicamente la forma semiquinona aniónica de su cofactor, ni forma un aducto con el sulfito. Estos hechos resultan más llamativos al existir un residuo con carga positiva en las inmediaciones del C4a de la flavina que debería favorecer estas reacciones. Los estudios de especificidad de sustrato pusieron de manifiesto que la AAO sólo está implicada en reacciones de oxidación de alcoholes y aldehídos, siendo incapaz de catalizar las reacciones de desmetilación, desaminación e hidroxilación descritas para otras oxidasas de alcoholes aromáticos. Los sustratos típicos de la AAO son alcoholes aromáticos o alifáticos poliinsaturados con un hidroxilo primario en el C_α . El centro activo de la AAO tiene afinidad por compuestos con sistemas de dobles enlaces conjugados, con independencia de que contengan grupos hidroxilo alcohólicos, como han puesto de manifiesto estudios de inhibición. La actividad aldehído oxidasa fue puesta de manifiesto en los estudios cinéticos utilizando mezcla rápida con flujo detenido, donde se vio que presentaba actividad frente a los aldehídos generados por la propia enzima. Además mediante ^{19}F NMR se pudo identificar el producto ácido de la reacción aldehído-oxidasa sobre el *p*-fluorobenzaldehído. Los estudios de cinética rápida con los alcoholes *p*-anisílico, 3-cloro-*p*-anisílico y veratrílico y el *p*-anisaldehído pusieron de manifiesto la dependencia de las cinéticas de reducción de la AAO del tipo sustrato. Los resultados obtenidos para

distintas concentraciones de alcohol *p*-anisílico permitieron el cálculo de las constantes de reducción (k_2 303 s⁻¹) y disociación (k_d 34 μ M) para este compuesto.

La AAO presenta una moderada homología de secuencia con la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* lo que permitió su modelado por homología (entrada PDB 1QJN). La comparación de la estructura primaria de la AAO con la glucosa oxidasa y otros miembros de la familia GMC de oxidorreductasas de la que la glucosa oxidasa forma parte, reveló la existencia en la secuencia de la AAO de los cuatro motivos conservados en esta familia (aunque con dos residuos diferentes en uno de ellos, *signature 1* PS000623). Este hecho, junto con las similares características estructurales encontradas, han llevado en este trabajo a incluir a la AAO de *P. eryngii* como un nuevo miembro de la familia GMC de oxidorreductasas. La arquitectura molecular general de la AAO presenta dos dominios estructurales: i) dominio de unión del FAD con el motivo conservado $\beta\alpha\beta$ de unión al ADP; y ii) dominio de unión al sustrato. En este último se ha identificado un canal de acceso al centro activo de naturaleza fundamentalmente hidrofóbica y de características similares al observado en otras oxidasas como la glucosa oxidasa. En los estudios de acoplamiento molecular de la AAO con distintos sustratos se observó que éstos se localizaban en las inmediaciones del cofactor, pudiendo describirse un bolsillo de unión de los sustratos. Posteriores estudios de mutagenesis dirigida confirmaron el papel de alguno de los residuos del centro activo de la AAO en la actividad catalítica de la enzima. Estos estudios mostraron la necesidad de un residuo aromático en las posiciones ocupadas por Y92 y F501, ya que la actividad de la AAO se mantuvo tras las sustituciones F \rightarrow Y o Y \rightarrow F. Las constantes cinéticas de las variantes obtenidas sugieren que ambos residuos podrían modular el potencial redox del FAD, y Y92 podría también contribuir a la adecuada orientación de los sustratos. Simultáneamente se mostró que dos histidinas próximas al N5 del anillo de flavina (H502 y H546) y a la probable localización del hidroxilo del sustrato, son indispensables para la actividad catalítica (tal como se vio al sustituirlas por residuos de serina, leucina o arginina). Se propone que estas dos histidinas, altamente conservadas en la familia GMC de oxidorreductasas, actuarían como bases activas en la reacción de oxidación de los sustratos, a través de un mecanismo de deshidrogenación por transferencia directa de un hidruro y reducción del FAD.

Contenido

	Página
Introducción	
1. Estructura y biodegradación de la lignina	1
1.1. La lignina	2
1.2. Sistema ligninolítico de los hongos de podredumbre blanca	4
2. Flavoenzimas	9
2.1. Clasificación de las flavoproteínas	10
2.2. Reacción de deshidrogenación	13
3. Características estructura-función de la flavoenzimas	15
3.1. Sitio de unión de la flavina	15
3.2. Sitio de unión del sustrato	16
4. La glucosa oxidasa: una flavoenzima modelo	17
5. Flavoenzimas que oxidan alcoholes aromáticos	18
5.1. Aril-alcohol oxidasa y vainillil-alcohol oxidasa	18
5.2. La AAO de <i>P. eryngii</i>	19
6. Objetivos generales de este trabajo	21
 Materiales y métodos	
1. Microorganismos y vectores plasmídicos	25
1.1. Cepas fúngicas	25
1.2. Cepas bacterianas	25
1.3. Vectores	25
2. Medios de cultivo	26
2.1. Medios de cultivo para hongos	26
2.2. Medios de cultivo para bacterias	29
3. Mantenimiento y cultivo de los microorganismos	31
3.1. Mantenimiento de <i>E. coli</i>	31
3.2. Cultivo de <i>E. coli</i>	31
3.3. Mantenimiento de las cepas fúngicas	31
3.4. Cultivo de <i>P. eryngii</i>	32
3.4.1. Obtención de los inóculos	32
3.4.2. Producción de AAO	32

4. Determinaciones analíticas	33
4.1. Determinación de proteínas	33
4.2. Cálculo de coeficientes de extinción molar	33
4.2.1. Coeficientes de extinción molar de aldehídos	33
4.2.2. Coeficiente de extinción molar de la AAO	34
4.3. Determinación de la actividad AAO	34
4.3.1. Definición de unidad enzimática	34
4.3.2. Estimación espectrofotométrica	35
5. Métodos de análisis de ácidos nucleicos	35
5.1. Reactivos específicos	35
5.1.1. Ácidos nucleicos	35
5.1.2. Antibióticos	36
5.1.3. Enzimas de restricción y modificadoras	36
5.2. Obtención y purificación de ácidos nucleicos	36
5.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	36
5.2.2. Cuantificación y estimación de la pureza	37
5.2.3. Digestión y modificación del DNA	37
5.3. Electroforesis en geles de agarosa	37
5.4. Secuenciación del DNA	38
6. Expresión heteróloga	38
6.1. Expresión en <i>E. nidulans</i>	38
6.1.1. Vector de expresión	38
6.1.2. Transformación de <i>E. nidulans</i>	38
6.1.3. Cultivo de la cepa de <i>E. nidulans</i> transformada	40
6.2. Expresión en <i>E. coli</i>	41
6.2.1. Vector de expresión	41
6.2.2. Transformación y crecimiento W3110 de <i>E. coli</i>	41
6.2.3. Obtención y solubilización de cuerpos de inclusión	42
6.2.4. Plegado <i>in vitro</i>	42
7. Purificación de la AAO	43
7.1. Purificación de la AAO salvaje y recombinante	43
7.1.1. Filtración y concentración	43
7.1.2. Cromatografía de exclusión molecular	43
7.1.3. Cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia	44
7.2. Purificación de la AAO* de <i>E. coli</i>	45
7.2.1. Filtración y concentración	45
7.2.2. Cromatografía de intercambio iónico	46
7.3. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	46
7.3.1. Preparación del gel	46

7.3.2. Realización de las electroforesis	47
7.3.3. Tinción de proteínas	48
8. Caracterización de la AAO* de <i>E. nidulans</i> y <i>E. coli</i>	48
8.1. Determinación de características físico-químicas	48
8.1.1. Temperatura óptima	48
8.1.2. pH óptimo	48
8.1.3. Estabilidad al pH	49
8.1.4. Estabilidad a la temperatura	49
8.1.5. Masa molecular	49
8.2. Determinación del grado y tipo de glicosilación	49
8.3. Determinación de la secuencia N-terminal	50
8.4. Propiedades espectrofotométricas	50
8.4.1. Espectro de absorción FAD-AAO	50
8.4.2. Reducción de la AAO con ditionito	50
8.4.3. Reactividad de la AAO con sulfito	51
8.4.4. Reducción de la AAO con alcohol anisílico	51
8.4.5. Fotorreducción	51
8.5. Caracterización cinética	52
8.5.1. Especificidad de sustrato	52
8.5.1.1. Sustratos empleados	52
8.5.1.2. Constantes cinéticas de estado estacionario	52
8.5.2. Estudios de inhibición	53
8.5.3. Cinéticas rápidas con flujo detenido (<i>stopped-flow</i>)	53
8.5.3.1. Preparación de las muestras en anaerobiosis	53
8.5.3.2. Medidas en el equipo de <i>stopped-flow</i>	54
8.5.3.3. Ajuste y obtención de parámetros cinéticos	54
8.6. Estudios por ¹⁹ FNMR	54
8.6.1. Sustratos empleados	54
8.6.2. Condiciones de reacción	55
8.6.3. Análisis espectroscópico	55
9. Dicroísmo circular	55
10. Obtención de variantes de la AAO por mutagenesis dirigida	56
10.1. Diseño y síntesis de los oligonucleótidos	56
10.2. Reacción de PCR e incorporación de la mutación	57
10.3. Digestión del DNA plasmídico parental	58
11. Análisis informáticos	58
11.1. Acoplamiento molecular (<i>docking</i>)	58
11.2. Análisis de los modelos moleculares	59

Resultados

1. Expresión heteróloga de la AAO de <i>P. eryngii</i>	63
1.1. Expresión heteróloga de la AAO en <i>E. nidulans</i>	63
1.1.1. Sistema de expresión en <i>E. nidulans</i>	63
1.1.2. Producción y purificación de la AAO* de <i>E. nidulans</i>	63
1.1.3. Procesamiento N-terminal de la AAO* en <i>E. nidulans</i>	66
1.2. Expresión heteróloga de la AAO en <i>E. coli</i>	68
1.2.1. Sistema de expresión en <i>E. coli</i>	68
1.2.2. Producción y purificación de la AAO* de <i>E. coli</i>	69
2. Caracterización físico-química de la AAO*	71
2.1. pH óptimo y estabilidad al pH	71
2.2. Temperatura óptima y estabilidad a la temperatura	73
2.3. Masa molecular	73
2.4. Grado y tipo de glicosilación	73
3. Estudios de especificidad de sustrato	74
3.1. Especificidad de sustrato de la AAO* de <i>E. nidulans</i>	74
3.1.1. Búsqueda de nuevos sustratos	74
3.1.2. Estudios de especificidad mediante ^{19}F NMR	75
3.1.3. Constantes cinéticas en estado estacionario	76
3.1.4. Estudios de inhibición	79
3.2. Especificidad de sustrato de la AAO* de <i>E. coli</i>	80
4. Caracterización espectroscópica	81
4.1. Grupo prostético	82
4.2. Reacciones de reducción del FAD	82
4.2.1. Reducción con ditionito y reacción con sulfito	83
4.2.2. Reducción por el sustrato	84
4.2.3. Fotorreducción	85
5. Estudios de cinética rápida con flujo detenido	86
5.1. Reacción de reducción	86
5.1.1. Reducción por alcohol <i>p</i> -anisílico	87
5.1.2. Reducción por alcohol 3-cloro- <i>p</i> -anisílico	89
5.1.3. Reducción por alcohol veratrílico	91
5.1.4. Reducción por <i>p</i> -anisaldehído	93
5.2. Cinética de la reoxidación por el O_2	94
6. Estudios estructurales de la AAO	95
6.1. Estructura primaria: Comparación con otras oxidorreductasas	95
6.2. Análisis de la estructura secundaria por dicroísmo circular	98

6.3. Estructura tridimensional tras modelado por homología	99
6.3.1. Dominio de unión del FAD	99
6.3.2. Región intermedia	101
6.3.3. Dominio de unión de sustratos	102
6.4. Estudios de acoplamiento molecular (<i>docking</i>) con sustratos	104
7. Estudios de mutagenesis dirigida	104
7.1. Diseño de las mutantes	104
7.2. Construcción de las variantes de la AAO	105
7.3. Comparación de los transformantes de <i>E. nidulans</i>	106
7.4. Purificación y caracterización de las variantes	107
7.5. Propiedades catalíticas de las variantes obtenidas	108
Discusión	
1. Características de la AAO	113
2. Actividad catalítica de la AAO	115
2.1. Cinética de estado estacionario	116
2.2. Estudios de cinética rápida	118
3. Estudios estructura-función de la AAO	121
3.1. Un nuevo miembro de las oxidorreductasas GMC	121
3.2. Dominio de unión del FAD	124
3.3. Descripción del centro activo	125
3.3.1. Sitio de unión de los sustratos	125
3.3.2. Papel de los residuos H502 y H546 como bases	126
3.3.3. Papel de los residuos aromáticos	128
3.3.4. Otros residuos del bolsillo de unión de sustratos	129
4. Mecanismo de reacción de la AAO	130
Conclusiones	137
Bibliografía	141

Introducción

1. Estructura y biodegradación de la lignina

La madera y otros materiales lignocelulósicos representan la fuente de carbono renovable más abundante sobre la Tierra. La fabricación de papel es uno de los principales usos industriales de la biomasa lignocelulósica, pero ésta también representa una fuente potencial de biocombustibles y compuestos químicos como alternativa a las fuentes petroquímicas (no renovables). La mayor parte del carbono fijado durante la fotosíntesis se acumula en la pared vegetal. Esta pared cumple distintas funciones: de esqueleto, protección frente al ataque biológico, resistencia a los cambios de presión osmótica, y participación en el flujo de nutrientes (Betts *et al.*, 1991).

Los tres componentes principales de la pared celular de las plantas vasculares son la celulosa, la lignina y la hemicelulosa. Las moléculas que forman la pared celular vegetal se mantienen unidas mediante una combinación de enlaces covalentes y no covalentes. La celulosa esta formada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4), dando largas cadenas lineales que se unen entre si por puentes de hidrógeno formando microfibrillas. Las microfibrillas están agregadas mediante nuevos puentes de hidrógeno y se encuentran embebidas en una matriz de polisacárido no celulósico (la hemicelulosa) y lignina. La microfibrillas de celulosa adoptan disposiciones diferentes en las distintas capas de la pared de las fibras de la madera (Fengel y Wegener, 1984) (Fig. 1).

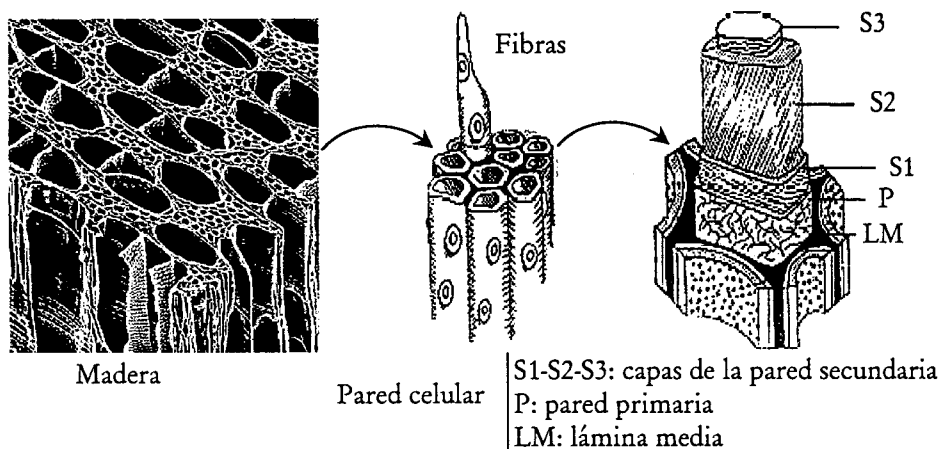


Figura 1. Estructura de la pared de las fibras de la madera. Se muestra la lignina en la lámina media (de color oscuro) y las microfibrillas de celulosa con distintas orientaciones en las capas de la pared secundaria.

La hemicelulosa es un polisacárido de menor peso molecular y de cadena más corta y ramificada que la celulosa. Puede incluir unidades de D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa, y de los ácidos 4-O-metil-glucorónico y D-galacturónico. La hemicelulosa es de naturaleza amorfa y forma junto a la lignina la matriz en la cual se incrustan las fibrillas de celulosa que constituyen la mayor parte de la pared secundaria (ver Fig. 1). Por otra parte, la mayor concentración de lignina existe en la lámina media que actúa como capa de unión entre las fibras. La estructura de la celulosa es la misma en los diferentes tipos de madera y otros materiales lignocelulósicos. Sin embargo, en las hemicelulosas existe una considerable variación, especialmente entre las angiospermas y gimnospermas (las primeras son en general más ricas en mananos mientras que las segundas suelen contener más xilanos) y lo mismo ocurre respecto a la composición de la lignina como se explica más adelante (Fengel y Wègener, 1984).

1.1. La lignina

La lignina es un polímero aromático tridimensional que protege a la celulosa en la pared secundaria y une las fibras a través de la lámina media. La biosíntesis de la lignina en plantas vasculares se produce a partir de la fenilalanina, a través de la ruta de los ácidos cinámicos (Higuchi, 1997). Inicialmente se sintetizan los tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos - *p*-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico) - que actúan como precursores de la lignina (monolignoles). Su polimerización deshidrogenativa iniciada por peroxidasa y/o lacasa vegetales da lugar respectivamente a las unidades 4-hidroxifenilpropano (H), guayacilpropano (G) y siringilpropano (S) de la lignina. Muy recientemente se ha descrito la existencia de unidades acetiladas derivadas de los correspondientes *p*-hidroxicinamil acetatos (del Río *et al.*, 2004; Lu y Ralph, 2002). Las diferentes unidades de fenilpropano están unidas entre sí por una variedad de enlaces, el tipo éter β -O-4 (entre el C-4 del anillo bencénico y el C-2 de la cadena lateral) es el más abundante llegando hasta un 55% en la lignina de algunas maderas (Fig. 2, subestructura 1). Existen además otros tipos de enlace éter y C-C entre las diferentes unidades. Como consecuencia de la frecuente presencia de enlaces éter, en los que participa el C-4, la mayor parte de las unidades de la lignina son no fenólicas y difíciles de degradar, a pesar de que los alcoholes precursores son de tipo fenólico.

La heterogeneidad de la lignina se produce por una expresión diferencial de las enzimas que intervienen en la ruta de los ácidos cinámicos, que conduce a diferentes proporciones de unidades H, G y S (Donaldson, 2001; Higuchi, 1997). La gran variedad de tipos de unidades y de enlaces no hidrolizables, junto a la falta de regularidad en la estructura, confieren gran complejidad al polímero de lignina (Fig. 2) (Fengel y Wegener, 1984; Karhunen *et al.*, 1995). Todo ello hace que sea posible observar diferencias en el contenido, distribución y composición de la lignina a nivel de tejidos e incluso entre las diferentes capas de la pared celular (Fergus y Goring, 1970; Higuchi, 1990).

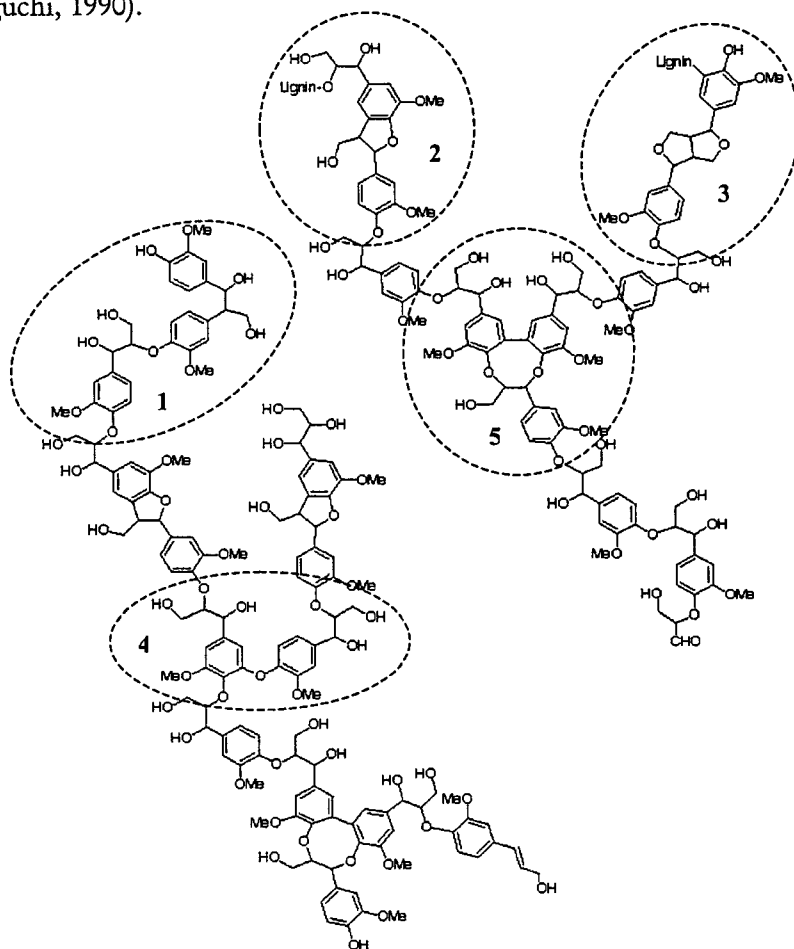


Figura 2. Estructura química de la lignina. Modelo de la lignina de coníferas formada por polimerización deshidrogenativa del alcohol coniferílico en el que se muestran unidades G formando diferentes tipos de subestructuras (ver texto).

En función de la proporción de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos que actúan como precursores se pueden distinguir tres tipos de lignina: la lignina de maderas blandas (gimnospermas), la lignina de maderas duras (angiospermas leñosas) y la de plantas herbáceas (angiospermas no leñosas) (Betts *et al.*, 1991). La lignina en gimnospermas es principalmente de tipo G, en angiospermas están presentes unidades G y S, y en las angiospermas no leñosas existen también unidades H.

La Fig. 2 presenta un modelo esquemático actualizado de la lignina de coníferas, en el que se muestran unidades G formando cinco tipos de subestructuras: 1) éter guayacilglicerol- β -arílico; 2) fenilcumarano; 3) pinorresinol; 4) éter difenílico; y 5) dibenzodioxocina. Mientras que 1-4 son estructuras diméricas ya incluidas en los primeros modelos de lignina de coníferas (Adler, 1977), la estructura 5 recientemente descrita (Karhunen *et al.*, 1995) es una estructura trimérica en la que los grupos OH de un bifénilo fenólico forman dos enlaces éter con los OH de la cadena lateral de una tercera unidad.

La madera contiene 20-30% de lignina lo que convierte a esta última en el compuesto aromático más abundante en la tierra, y probablemente el más recalcitrante. Por ello, la degradación de la lignina y su reciclaje constituyen un evento esencial en el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres, en el que participan fundamentalmente los basidiomicetos de podredumbre blanca de la madera (Crawford, 1981; Zabel y Morrell, 1992). Estos hongos son los únicos organismos capaces de despolimerizar y mineralizar el polímero de lignina, permitiendo de esta forma el acceso a los carbohidratos que están embebidos en la matriz de lignina y hemicelulosa (Crawford, 1981; Hammel, 1997). Este proceso se lleva a cabo, a través de un sistema degradativo no específico y complejo formado por enzimas extracelulares, metabolitos de bajo peso molecular y especies activas de oxígeno capaces de atacar al polímero (Schoemaker, 1990).

1.2. Sistema ligninolítico de los hongos de podredumbre blanca

El paso clave en la degradación de la lignina es el ataque inicial por agentes extracelulares responsables de su despolimerización, y liberación de compuestos de bajo peso molecular, que sufren posteriores reacciones y son finalmente mineralizados intracelularmente. En general todos los agentes ligninolíticos, incluyendo enzimas y compuestos de bajo peso molecular (que a menudo actúan como mediadores redox), degradan la lignina

mediante un proceso oxidativo (Kirk y Farrell, 1987). Las unidades de lignina son oxidadas monovalentemente a radicales libres (generalmente de tipo catiónico) que, en función de su estructura y condiciones del entorno, sufren diversas reacciones químicas incluyendo reacciones de despolimerización. Los compuestos de bajo peso molecular procedentes de la despolimerización de la lignina son finalmente metabolizados hasta CO_2 y H_2O_2 .

Las enzimas extracelulares fúngicas involucradas en el proceso de degradación de la lignina son de tipo oxidorreductasa, incluyendo lacasas, peroxidasas y oxidasas productoras de H_2O_2 (Kirk y Cullen, 1998; Kirk y Farrell, 1987).

Lacasas

Inicialmente se pensó que las lacasas debían desempeñar un papel esencial en la degradación de la lignina ya que su presencia constituye una característica típica de todos los hongos de podredumbre blanca (capaces de mineralizar la lignina transformando la madera en un material blanco enriquecido en celulosa) (Käärik, 1965). Las lacasas son metaloenzimas de tipo fenoloxidasas (EC 1.10.3.2) que contienen cobre en su centro activo y catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas sustituidos liberando H_2O al utilizar O_2 como aceptor final de electrones (Thurston, 1994). Debido a su bajo potencial redox, las lacasas sólo oxidan directamente las unidades fenólicas de la lignina (Kawai *et al.*, 1987b; Kawai *et al.*, 1987a). Sin embargo, también son capaces de oxidar las unidades no fenólicas mediante un sistema en el que están implicados compuestos de bajo peso molecular naturales (incluyendo metabolitos fúngicos) o sintéticos que actúan como mediadores redox (sistema lacasa-mediador) (Bourbonnais y Paice, 1992). Las lacasas también pueden participar en la formación de especies activas del oxígeno, como el radical hidroxilo (OH^\bullet), durante la oxidación de hidroquinonas. Los productos de esta reacción pueden reducir el hierro férrico a la forma ferrosa que, en presencia de H_2O_2 , da lugar a la reacción de Fenton (Guillén *et al.*, 2000).

Peroxidasas

La primera peroxidasa ligninolítica fue identificada en el hongo *Phanerochaete chrysosporium* (lignina peroxidasa, LiP) (Glenn *et al.*, 1983; Tien y Kirk, 1983). Esta enzima oxida compuestos aromáticos de alto potencial

redox como el alcohol veratrílico (3,4-dimetoxibencílico) y dímeros modelo de lignina de tipo no fenólico (incluyendo los enlaces más frecuentes mencionados anteriormente). Posteriormente se descubrió la manganeso peroxidasa (MnP), que depende de iones Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico y oxida compuestos de tipo fenólico a través del Mn^{3+} formado (estabilizado en forma de quelatos).

En otros basidiomicetos se ha encontrado recientemente un tercer tipo de peroxidasa ligninolítica, que comparte propiedades catalíticas con la LiP y la MnP. Esta enzima, denominada peroxidasa versátil (VP), se describió inicialmente en *Pleurotus eryngii* (Camarero *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 1996; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999a; 1999b) pero es también producida por otras especies de *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Martínez, 2002). Además de oxidar eficientemente el Mn^{2+} , la VP oxida compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos y colorantes.

Las peroxidasas que oxidan Mn^{2+} (MnP y VP) también pueden degradar compuestos aromáticos no fenólicos a través de radicales de peroxidación de lípidos insaturados (Bao *et al.*, 1994).

Oxidasas productoras de H_2O_2

Antes de describirse el papel de las peroxidasas en la degradación de la lignina ya se había observado en *P. chrysosporium* su capacidad para producir H_2O_2 , y la probable implicación de este compuesto en la degradación de la lignina (Faison y Kirk, 1983; Koenigs, 1974). Inicialmente se pensó que el H_2O_2 requerido por las peroxidasas para degradar la lignina era producido por oxidasas intracelulares como la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) y metanol oxidasa (EC 1.1.3.13) (Kelley y Reddy, 1986; Nishida y Eriksson, 1987), pero el transporte del H_2O_2 al medio extracelular es complicado dado su fuerte carácter oxidante.

Los estudios posteriores se centraron en oxidasas extracelulares como la glioxal oxidasa (EC 1.1.3.-) de *P. chrysosporium* (Kersten y Kirk, 1987), una metaloenzima que oxida aldehídos alifáticos como el glioxal, y la aril-alcohol oxidasa (AAO; EC 1.1.3.7). Esta última es una flavoenzima que genera H_2O_2 dentro de un sistema cíclico de oxido-reducción de metabolitos aromáticos sintetizados por el hongo, incluyendo el *p*-anisaldehído (4-metoxibencílico), en el que también participan reductasas miceliarias (Fig. 3) (Guillén *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1994). Además de ser el co-sustrato de las peroxidasas ligninolíticas, el H_2O_2 podría

participar en la degradación de la lignina a través de la generación de otras especies activas de oxígeno. Entre éstas se encuentra el OH^\bullet , fuerte oxidante que podría estar implicado en el ataque inicial a la lignina cuando las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar en la pared celular debido a su compacta arquitectura molecular descrita anteriormente (Backa *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1994; Guillén *et al.*, 2000). También ha sido descrito que la AAO evita la repolimerización de los productos liberados durante la biodegradación de la lignina (Marzullo *et al.*, 1995).

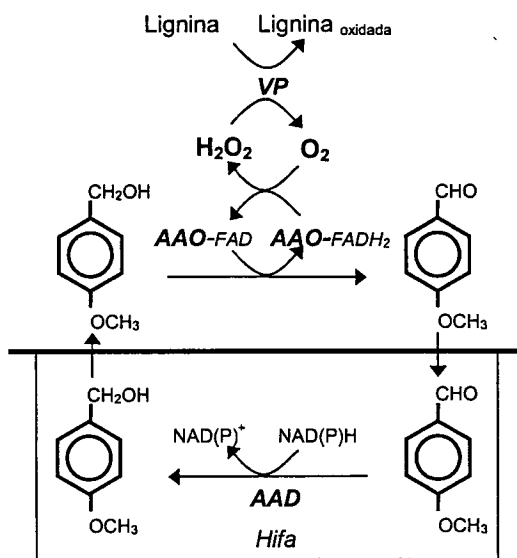


Figura 3. Esquema de la producción de H_2O_2 en *Pleurotus*. El H_2O_2 se produce mediante un sistema cíclico de oxido-reducción de *p*-anisalaldehído mediado por una aldehído deshidrogenasa intracelular (AAD) y la AAO, y es utilizado por la VP. Adaptado de Varela *et al.* (2000b).

Para concluir este apartado sobre biodegradación de la lignina, la Fig. 4 muestra un esquema general del mecanismo propuesto para su degradación por especies del género *Pleurotus*, señalando el papel de las principales enzimas descritas anteriormente y las diferentes reacciones producidas: a) oxidación de unidades de lignina no fenólicas (90%) por VP y lacasa-mediador (en el caso de las unidades fenólicas minoritarias se produciría directamente radical fenoxilo); b) rotura del enlace éter en el C-4 originándose un radical fenoxilo; c) apertura del anillo aromático; d) rotura

2. Flavoenzimas

Las flavoenzimas catalizan un amplio rango de reacciones bioquímicas, tales como deshidrogenaciones, transferencia de uno o dos electrones, activación del oxígeno para dar lugar a reacciones de oxidación e

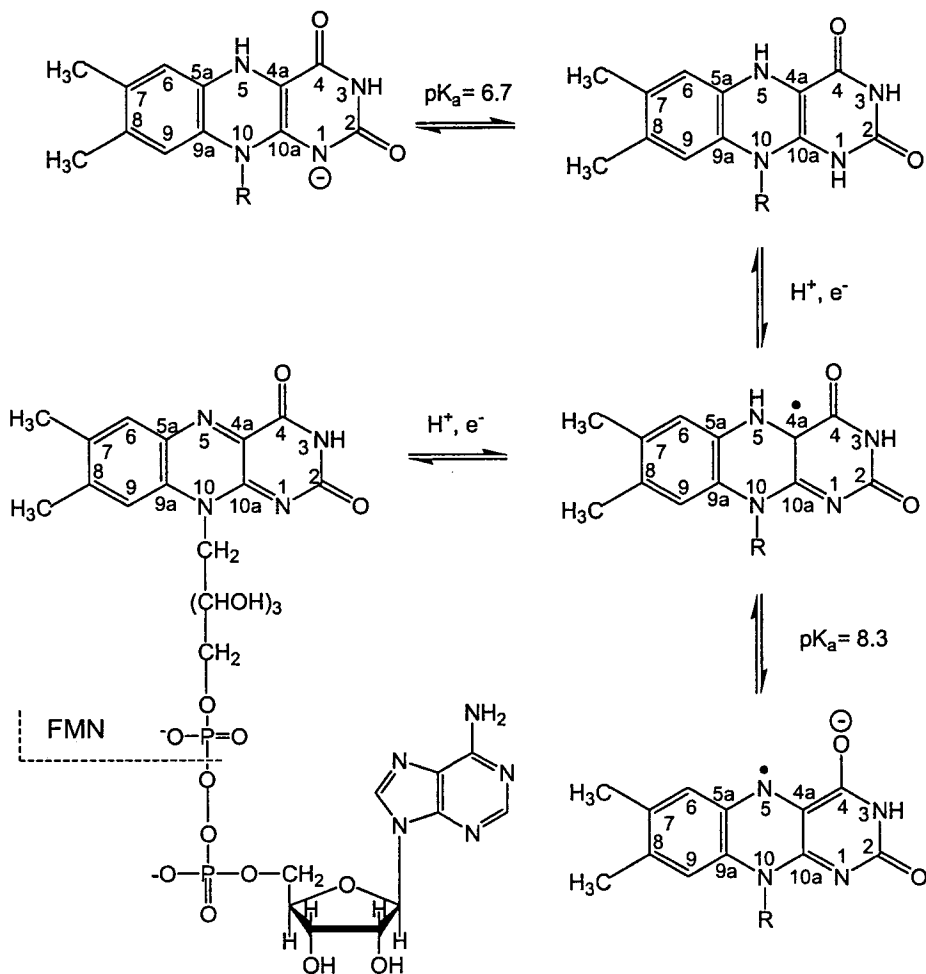


Figura 5. Estructura del FAD o el FMN libre en su forma oxidada o quinona, semiquinona (centro) y totalmente reducida o hidroquinona (arriba). A pH alcalino la semiquinona puede encontrarse en forma de radical aniónico de color rojo (abajo), mientras que la forma neutra presenta color azul. Adaptado de Müller (1991).

hidroxilación, y emisión de luz (Massey, 1995). Estas proteínas pueden llevar como cofactores flavín-adenín mononucleótido (FMN) o flavín-adenín dinucleótido (FAD) (Fig. 5). Estos grupos prostéticos son esenciales para su actividad enzimática, salvo algunas excepciones como la hidroxinitrilo liasa (EC 4.1.2.10), en la que no se sabe que el FAD esté implicado en reacciones redox, sugiriéndose que desempeña un papel estructural (Dreveny *et al.*, 2001; Ghisla y Massey, 1989; Jorns, 1979).

El ciclo catalítico de las flavoenzimas lo componen dos reacciones: una primera reacción de reducción, donde la flavina es reducida por un compuesto donador de electrones, y una segunda reacción de oxidación donde la flavina reducida es reoxidada, transfiriendo los electrones a un compuesto aceptor y completando así su ciclo. La parte reactiva de la flavina (7,8-dimetilbenzo[g]pteridina-2,4(3H, 10H)-diona) es el anillo de isoaloxazina. Esta es una molécula anfipática formada por la fusión de un dimetilbenzeno (parte hidrofóbica) con un anillo de pteridina (para hidrofílica). Su reducción es reversible e implica una serie de cambios químicos en el anillo de flavina que afectan a las posiciones N1, C4a y N5. La reducción puede ser en un o dos pasos, dependiendo si se transfieren dos electrones o un electrón respectivamente. El potencial redox de la flavina libre es de unos -200 mV, pero en las flavoenzimas puede variar en un rango entre -400 mV y +60 mV dependiendo del entorno aminoacídico (Ghisla y Massey, 1989).

2.1. Clasificación de las flavoproteínas

Tradicionalmente las flavoproteínas han sido agrupadas en clases, caracterizándose los miembros de cada clase por las reacciones bioquímicas que catalizan, su habilidad para reaccionar con el oxígeno o la naturaleza de sus centros redox auxiliares. De esta forma pueden distinguirse las cinco clases indicadas a continuación (Massey, 1994; Massey y Hemmerich, 1980).

Clase 1. Deshidrogenasas/Transhidrogenasas

El cofactor es reducido vía dos electrones, previa oxidación y deshidrogenación del compuesto donador. Dependiendo de la naturaleza de los átomos que actúan como donadores y aceptores de hidrógeno, se subclasifican en carbono-carbono transhidrogenasas, carbono-azufre transhidrogenasas, carbono-nitrógeno transhidrogenasas y nitrógeno-

nitrógeno transhidrogenasas. Ejemplos de esta clase son la DT-diaforasa (EC 1.6.92.2) y la familia de las disulfuro reductasas. Por lo general estas deshidrogenasas no forman una semiquinona estable, presentan muy poca reactividad con el oxígeno y forman principalmente H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$ (Massey *et al.*, 1969).

Clase 2. Deshidrogenasas/Oxidasas

Este tipo de flavoenzimas catalizan un amplio rango de reacciones de oxidación, tales como la oxidación de alcoholes o aminas, y otras más complejas como la oxidación selectiva de alcaloides en plantas (Kutchan y Dittrich, 1995). Estas reacciones se caracterizan por tener dos sustratos: un dador de electrones (sustrato propiamente dicho) y el oxígeno molecular (aceptor de electrones).

En la oxidación del sustrato se produce la ruptura de un enlace C-H, transfiriéndose los dos electrones al anillo de flavina. La flavina reducida es reoxidada mediante la reducción del O_2 a H_2O_2 sin formación aparente de intermediarios estables (Massey, 1994):



(S: sustrato; P: producto; E-FAD: flavoenzima)

Como ejemplos de oxidasas ampliamente estudiadas cabe mencionar: D-aminoácido oxidasa (EC 1.4.3.3), glicolato oxidasa (EC 1.1.3.15), glucosa oxidasa, colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6) y vainillil-alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13). En general presentan características comunes, como la estabilización termodinámica de la flavina en forma semiquinona aniónica y su reactividad con el sulfito sódico formando un aducto con el N5 de la flavina.

Clase 3. Deshidrogenasas/Monooxigenasas

En estas flavoproteínas, la enzima en su forma reducida reacciona con el O_2 formando un intermediario estable de tipo hidroperóxido en el C4a de la flavina (van Berkel y Muller F, 1991). Estas enzimas no suelen estabilizar la forma semiquinona, ni muestran reactividad frente al sulfito sódico. Las monooxigenasas presentan tres sustratos, el NAD(P)H que reduce a la

enzima, el sustrato que será oxigenado y el O_2 . El intermediario en forma hidroperóxido de la flavina reacciona con el sustrato aceptor al que transfiere un átomo de oxígeno, formándose una C4a-hidroxiflavina que, por deshidratación, retorna a su forma oxidada liberándose H_2O . Como ejemplos podríamos citar la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (EC 1.14.13.2) (Entsch y van Berkel, 1995) donde un sustrato aromático es hidroxilado en posición orto con respecto al grupo activante.

En ausencia de un aceptor de electrones el intermediario de tipo hidroperóxido termina desapareciendo con la formación de H_2O_2 (reacción de tipo oxidasa).

Clase 4. Deshidrogenasas/Electrón-transferasas

Las enzimas de esta clase llevan a cabo reacciones de deshidrogenación y transferencia de dos electrones a la flavina, pero el ciclo catalítico es completado por transferencia secuencial de los dos electrones de la flavina reducida a otra flavoproteína, con la formación de intermediarios de tipo semiquinona. Un ejemplo de esta clase es acil-coA deshidrogenasa (EC 1.3.99.3) que oxida moléculas de acil-coA por abstracción de un protón del C_α y la transferencia de electrones desde el C_β al N5 de la flavina (Ghisla y Massey, 1989). Esta enzima forma semiquinona azul neutra en ausencia de producto y aniónica roja en su presencia.

Clase 5. Electrón-transferasas

Las electrón-transferasas, como la flavodoxina (Ludwig y Luschinsky, 1991) y la ferredoxina-NADP reductasa (Karplus *et al.*, 1991), no catalizan reacciones de deshidrogenación de los sustratos sino reacciones de transferencia de un electrón entre un donador y un aceptor. En su reacción con el O_2 producen $O_2^{\cdot -}$ (Massey *et al.*, 1969). En general estabilizan termodinámicamente la flavina en forma semiquinona neutra pero no suelen reaccionar con el sulfito.

Clase 6. Flavoproteínas complejas

Además existen flavoproteínas con centros redox auxiliares ("flavoproteínas complejas"). Entre ellas se encuentran los flavocitocromos que contienen un grupo hemo auxiliar, siendo el mejor ejemplo la lactato

deshidrogenasa (EC 1.1.2.4), que incluye FMN como grupo prostético y un citocromo tipo b (Xia y Mathews, 1990). Otra flavoproteína compleja es la celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18) que contiene un dominio de citocromo tipo b y otro con FAD como cofactor (Hallberg *et al.*, 2002). También existen metalo-flavoproteínas como la xantina oxidasa (EC 1.1.3.22) que junto al FAD contiene sulfuro de hierro y molibdeno, y algunas flavoproteínas bacterianas implicadas en la degradación de benceno y catecol que contienen en FMN como cofactor y un centro auxiliar con sulfuro de hierro (Gassner *et al.*, 1995).

2.2. Reacción de deshidrogenación

Las flavoproteínas están implicadas en la deshidrogenación de una gran variedad de compuestos (ditioles, alcoholes, aminas, nucleótidos de nicotinamida reducidos, α -hidroxiácidos, etc.). El mecanismo de oxidación de estos sustratos conlleva la ruptura de un enlace C-H, la transferencia de dos electrones desde el sustrato a la flavina y la formación de un producto oxidado con un doble enlace. En estas reacciones de deshidrogenación existe un grupo activante, adyacente al centro de ataque oxidativo, que facilita la reacción (Fig. 6).

Muchas flavoproteínas catalizan reacciones de α , β deshidrogenación. En estas reacciones el átomo de carbono en posición α con respecto a un grupo carbonilo o carboxilato es desprotonado por una base, lo que permite la formación de un doble enlace en posición α , β . Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la reacción mediante la cual las flavoproteínas catalizan las reacciones de deshidrogenación (Fraaije y Mattevi, 2000; Ghisla y Massey, 1989) (ver Fig. 6):

- *Transferencia de un hidruro*: Se produce una transferencia directa del anión hidruro desde el grupo C-H del sustrato al N5 de la flavina (de esta forma tiene lugar la transferencia simultánea de dos electrones y un protón).
- *Mecanismo a través de radicales*: En la ruptura del enlace C-H se libera el átomo de hidrógeno del sustrato que pasa al N5 formándose un radical del sustrato y otro de la flavina (transferencia de un electrón y un protón), y en un segundo paso se obtiene la flavina reducida y el producto oxidado (por transferencia de un segundo electrón).

- **Mecanismo carboaniónico:** Requiere de una base que retire el protón del grupo C-H del sustrato, originándose una forma carboaniónica que dona los dos electrones a la flavina de manera directa o formando un intermediario covalente (a continuación se transfiere un protón).

Para muchas flavoenzimas está propuesto un mecanismo de transferencia de hidruro, aunque no existe realmente un consenso, y en algunos casos existe una gran controversia como para la D-aminoácido oxidasa (Lederer *et al.*, 1996).

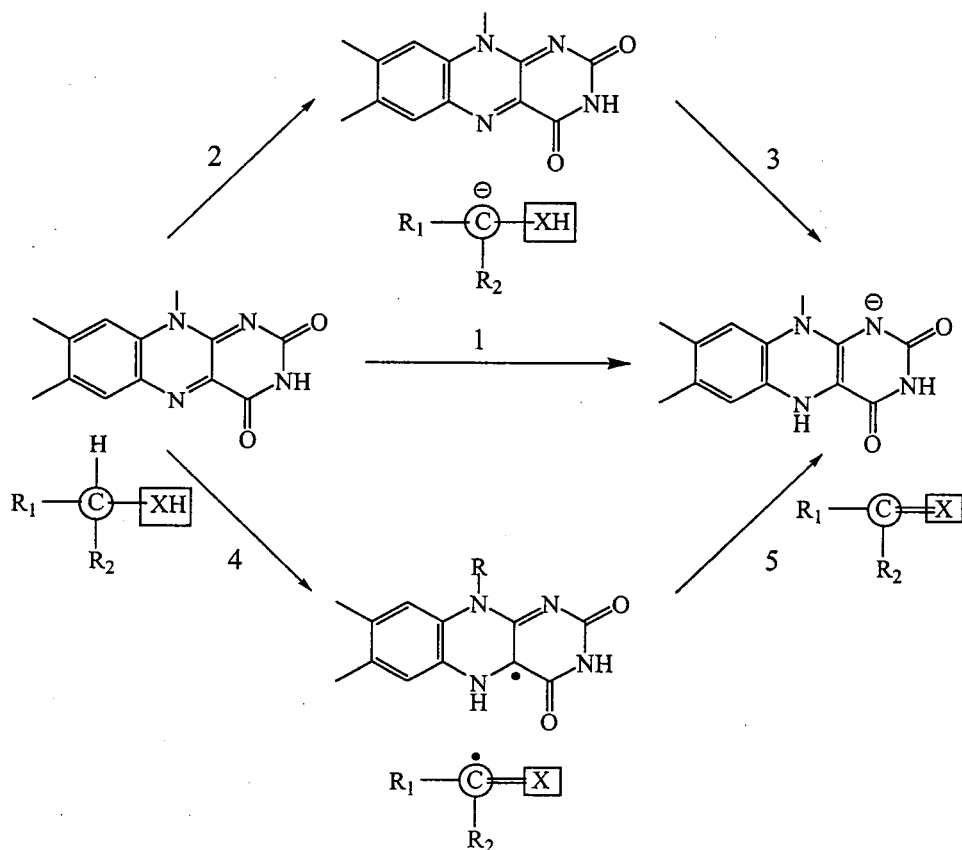


Figura 6. Posibles mecanismos de las reacciones de deshidrogenación catalizadas por flavoenzimas: Transferencia directa de un hidruro (1), mecanismo carboaniónico (2 y 3), mecanismo a través de radicales (4 y 5). El centro de ataque oxidativo aparece rodeado por un círculo, y el grupo activante enmarcado (R1 y R2 indican sustituyentes no especificados). Adaptado de Fraaije y Mattevi (2000).

3. Características estructura-función de las flavoenzimas

Durante estos últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de las relaciones estructura-función de algunas flavoenzimas. Esto se ha debido en gran medida al análisis de sus estructuras cristalográficas (Fraaije y Mattevi, 2000), a los estudios realizados por mutagénesis dirigida y a simulaciones moleculares con sustratos e inhibidores (Friesner y Beachy, 1998). En la actualidad, se dispone de la estructura cristalográfica de unas 200 flavoproteínas (con FAD o FMN como cofactor). No existe una clara relación entre la estructura general y la función. Así flavoproteínas con topologías similares presentan propiedades funcionales distintas. Por ejemplo, oxidasas de tipo D- aminoácido oxidasa y colesterol oxidasa (Mattevi *et al.*, 1996; Mizutani *et al.*, 1996) poseen una topología similar en su dominio de unión al FAD (Mattevi, 1998; Wierenga *et al.*, 1983) con hidroxilasas (*p*-hidroxibenzoato hidroxilasa) y oxidorreductasas como la fumarato reductasa (EC 1.3.1.6) (Iverson *et al.*, 1999; Mattevi *et al.*, 1999; Schreuder *et al.*, 1989). Por el contrario, flavoenzimas funcionalmente relacionadas pueden llegar a tener topologías generales muy distintas como la vainillil-alcohol oxidasa y la AAO (Mattevi *et al.*, 1997; Varela *et al.*, 2000b).

De todas formas, y a pesar de su amplia diversidad catalítica, se puede hablar de una serie de propiedades estructura-función comunes en las flavoenzimas de tipo deshidrogenasas (Fraaije y Mattevi, 2000; Ghisla y Massey, 1989) tal como se explica a continuación.

3.1. Sitio de unión de la flavina

La mayoría de las flavoenzimas tienen como cofactor FAD o FMN disociable, existiendo muy pocos casos donde la unión es covalente a través de un enlace entre la cadena polipeptídica y la flavina (Decker, 1991). Algunos autores sugieren que la flavinización covalente confiere un mayor poder oxidativo a la flavina (Fraaije *et al.*, 1999). Por otro lado, se observa en general que una carga positiva en las inmediaciones del anillo de flavina tiende a incrementar el potencial redox, y que un ambiente hidrofóbico o una carga negativa tiende a disminuirlo (Ghisla y Massey, 1989; Massey, 1995).

En la formación del complejo enzima-cofactor, el anillo de flavina puede adoptar distintas conformaciones que se alejan más o menos de una

disposición completamente plana (Hecht *et al.*, 1993; Vrieling *et al.*, 1991). En su unión con la proteína, la flavina suele formar puentes de hidrógeno con aminoácidos del entorno del cofactor, y es común que el grupo pirofosfato del dinucleótido interaccione con la carga positiva asociada al efecto dipolo de una hélice- α que se encuentre en sus proximidades, contribuyendo a dicha unión. (Wierenga *et al.*, 1983; 1985; 1986). Por otra parte, la existencia de hélices- α o aminoácidos con carga positiva (lisina, arginina y histidina) próximos a la zona N1-C2O de la flavina (a distancias menores de 3,5 Å) contribuyen a estabilizar la forma aniónica de la flavina reducida.

El N5 del anillo de flavina participa directamente en la reacción de deshidrogenación, aceptando un protón del sustrato (Ghisla y Massey, 1989). Finalmente, la forma reducida de la flavina resulta menos energéticamente favorable que la forma oxidada.

3.2. Sitio de unión del sustrato

En la actualidad se conocen las estructuras cristalográficas de complejos enzima-sustrato o enzima-inhibidor de algunas oxidasas como: *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa/*p*-hidroxibenzoato (Schreuder *et al.*, 1989), colesterol oxidasa/D-hidroisoandrosterona (Li *et al.*, 1993), D-aminoácido oxidasa/D-aminobenzoato (Mattevi *et al.*, 1996) y vainillil-alcohol oxidasa/4-(1-heptenil)fenol (Mattevi *et al.*, 1997). Para la glucosa oxidasa (Meyer *et al.*, 1998) se ha modelado el sustrato en su centro activo. Los modelos cristalográficos muestran como el sustrato se sitúa en frente del anillo de flavina a una distancia de unos 3,5 Å del N5, definiendo un ángulo con N5-N10 de 96-117°. Otra característica común es la existencia de un canal o cavidad por la que se accede al centro activo desde su superficie, permitiendo así la entrada de los sustratos. El centro activo suele estar protegido de la exposición al solvente (Mattevi *et al.*, 1997) por distintos mecanismos: en D-amino ácido oxidasa, colesterol oxidasa y glicolato oxidasa (Stenberg y Lindqvist, 1997) existen lazos flexibles que actúan a modo de tapadera permitiendo la entrada de los sustratos y la salida de los productos, o bloqueando el acceso al centro activo cuando su conformación esta cerrada. En otras enzimas, como la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, el mismo anillo de flavina adopta una conformación "abierta" o "cerrada" que permite la unión del sustrato y liberación del producto respectivamente (Entsch y van Berkel, 1995; Moran *et al.*, 1996).

4. La glucosa oxidasa: una flavoenzima modelo

La glucosa oxidasa (β -D-glucosa-1-oxidorreductasa) fue descrita por primera vez en *Aspergillus niger* en 1928 (Müller, 1928). Esta flavoenzima cataliza la oxidación de β -D-glucosa a δ -glucolactona, que se hidroliza no enzimáticamente a ácido glucónico. Ha sido purificada de *A. niger* (Swoboda y Massey, 1965) y *Penicillium amagasakiense* (Kalisz *et al.*, 1990; Kusai *et al.*, 1960), organismos en los que ha sido ampliamente estudiada y caracterizada por su interés comercial (Wilson, 1992), así como de *Talaromyces flavus* (Kim *et al.*, 1990). La glucosa oxidasa fúngica es un homodímero de aproximadamente 160 kDa, que contiene FAD unido no covalentemente (una molécula por monómero) (Hayashi y Nakamura, 1976; Yoshimura y Isemura, 1971a; 1971b). En 1993 se resolvió la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa de *A. niger* por difracción de rayos X con una resolución de 2,3 Å (Hecht *et al.*, 1993). Posteriormente se publicó su estructura a 1,8 Å al mismo tiempo que se describió la estructura cristalografica de la glucosa oxidasa de *P. amagasakiense* (Wohlfahrt *et al.*, 1999). En el modelo cristalográfico de la glucosa oxidasa se observa la existencia de dos dominios, el de unión del FAD y el de unión de los sustratos. Sobre la

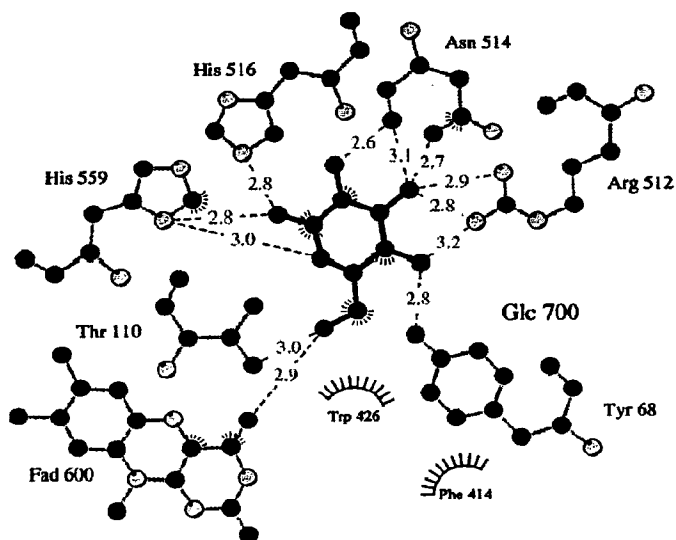


Figura 7. Representación esquemática tras modelado de la β -D-glucosa en el centro activo de la glucosa oxidasa de *A. niger*. Tomado de Wohlfahrt (1999).

estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa de *A. niger* y *P. amagasakiense* se han realizado estudios de acoplamiento molecular utilizando β -D-glucosa (Witt *et al.*, 2000; Wohlfahrt *et al.*, 1999). El modelado (Fig. 7) muestra la molécula de glucosa en el centro activo próxima al anillo de flavina, formando puentes de hidrógeno con el cofactor y H559, H516, N514, R512, T110 y contactos hidrofóbicos con F414, W426 y Y68. Posteriores estudios de mutagénesis dirigida apoyan esta disposición y confirman la participación de varios residuos en la actividad catalítica, siendo esencial en la unión del sustrato R512, que forma dos puentes de hidrógeno con el 3-OH de la β -D-glucosa (Witt *et al.*, 2000).

5. Flavoenzimas que oxidan alcoholes aromáticos

Las flavoproteínas están implicadas en la oxidación de una gran variedad de compuestos entre ellos alcoholes aromáticos. Se conocen dos tipos de flavoproteínas que oxidan estos compuestos: la AAO que oxida alcoholes aromáticos no fenólicos, y la vainillil-alcohol oxidasa que oxida alcoholes aromáticos activados por la presencia de un grupo fenólico.

5.1 AAO y vainillil-alcohol oxidasa

La AAO fue descrita por primera vez en 1960 (Farmer *et al.*, 1960) en *Trametes versicolor* (sinónimo: *Polystictus versicolor*). Posteriormente ha sido identificada y purificada en otros basidiomicetos ligninolíticos: *Pleurotus sajor-caju* (Bourbonnais y Paice, 1988), *Pleurotus eryngii* (Guillén *et al.*, 1988; 1990; 1992), *Pleurotus ostreatus* (Sannia *et al.*, 1991), *Bjerkandera adusta* (Muheim *et al.*, 1990b; 1990a), *Pleurotus pulmonarius* (Gutiérrez *et al.*, 1994; Varela *et al.*, 2000a) y *P. chrysosporium* (Asada *et al.*, 1995). También ha sido identificada en hongos de tipo ascomiceto como *Botrytis cinerea* (Goetghebeur *et al.*, 1992), *Fusarium proliferatum* (Regalado *et al.*, 1999) y especies de tipo *Geotrichum* (Kim *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2003), aunque algunos de éstos últimos podrían ser formas conidiales de basidiomicetos. Todas estas flavoenzimas son extracelulares, a excepción de la AAO de *P. chrysosporium* que se encuentra asociada al micelio, y contienen una molécula de FAD unida no covalentemente. Sus masas moleculares se sitúan entre 68 y 78 kDa. Las variaciones son debidas fundamentalmente a distintos grados de glicosilación, como ocurre en la AAO de distintas especies de *Pleurotus*. Estas

oxidasas catalizan la oxidación de alcoholes aromáticos primarios a sus correspondientes aldehídos con producción de H_2O_2 . Se caracterizan por poseer una baja especificidad de sustrato oxidando una amplia gama de alcoholes paromáticos con diferentes sustituyentes. Las AAO de especies de *Pleurotus*, *B. adusta* y *T. versicolor* tienen propiedades catalíticas similares, presentando las tasas más altas de oxidación frente al alcohol *p*-anisílico (4-metoxibencílico). Además, la AAO de *Pleurotus* es capaz de oxidar alcoholes alifáticos poliinsaturados. Desde un punto de vista fisiológico todas estas enzimas están implicadas en la actividad ligninolítica de los hongos que las producen al generar H_2O_2 (ver apartado 1.2) (Ander y Marzullo, 1997; Martínez *et al.*, 1994).

En *Penicillium simplicissimum* (hongo no ligninolítico) fue identificada en 1992 una alcohol oxidasa intracelular, inducida por alcohol veratrílico (de Jong *et al.*, 1992). Su caracterización reveló que era capaz de oxidar alcohol vainillílico (3-metoxi-4-hidroxibencílico) a vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) con producción de H_2O_2 , por lo que se la denominó vainillil-alcohol oxidasa. La vainillil-alcohol oxidasa es un óctamero de unos 500 kDa, que contiene una molécula de FAD por monómero unida covalentemente. Posteriormente se vio que esta flavoenzima era capaz de oxidar un amplio rango de compuestos incluyendo aminas aromáticas, alquilfenoles, alilfenoles y eter dimetílico (Fraaije *et al.*, 1995). La oxidación de estos compuestos es por un mecanismo de transferencia de un hidruro al FAD formándose un intermediario de tipo *p*-quinona, seguido de la desprotonación del sustrato (Drijfhout *et al.*, 1998; Fraaije y van Berkel, 1997). La vainillil-alcohol oxidasa forma parte de una nueva familia de oxido-reductasas que contienen FAD unido covalentemente (Fraaije *et al.*, 1998). En la actualidad se conoce su estructura cristalográfica (Mattevi *et al.*, 1997). Se han identificado tres residuos Y108, Y503 y R504 implicados en la activación de los sustratos a través de un intermediario de tipo *p*-quinona-metiluro (2,5-ciclohexadien-4-metilen-1-ona).

Recientemente ha sido descrita y caracterizada en larvas de insectos una salicil-alcohol oxidasa funcionalmente relacionada con las AAO y la vainillil-alcohol oxidasa (Bruckmann *et al.*, 2002).

5.2. AAO de *P. eryngii*

En 1988 se detectó por primera vez una actividad AAO productora de H_2O_2 en *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1988) coincidiendo con la descripción de

esta oxidasa en *P. sajor-caju* (Bourbonnais y Paice, 1988). La AAO se aisló y purificó de cultivos líquidos suplementados con extracto de levadura, alcanzándose los niveles más altos durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo (Guillén *et al.*, 1992). También ha sido detectada AAO en cultivos sobre sustratos lignocelulósicos desarrollados en condiciones de fermentación en estado sólido (Barrasa *et al.*, 1998; Camarero *et al.*, 1997; Valmaseda *et al.*, 1991). La AAO de *P. eryngii* es una glicoproteína monomérica de un peso molecular estimativo de 72,6 kDa, con un porcentaje de glicosilación del 11% (estimado por SDS/PAGE). Esta flavoproteína contiene FAD unido no covalentemente. Su extremo amino terminal incluye la secuencia consenso G-X-G-X-X-G del dominio de unión del FAD, ampliamente conservada en otras flavoenzimas (Wierenga *et al.*, 1985).

La AAO de *P. eryngii* fue clonada y secuenciada (Varela *et al.*, 1999), así como la de *P. pulmonarius* que muestra un 95% de identidad con la primera (Varela *et al.*, 2000a). La obtención del gen de la AAO permitió su expresión heteróloga en *Emericella nidulans* y más recientemente en *E. coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2001).

La AAO de *P. eryngii* presenta actua sobre una amplia variedad de compuestos aromáticos estructuralmente relacionados con la lignina y con metabolitos aromáticos secretados por el hongo. Los estudios de especificidad realizados por Guillén (1992) mostraron que puede oxidar alcoholes primarios con estructuras químicas muy diferentes tales como 2-naftalenmetanol, alcohol *p*-anisílico o 2,4-hexadien-1-ol, siendo el alcohol bencílico la estructura aromática más simple oxidada por la enzima (Fig. 8). Uno de sus mejores sustratos es el alcohol *p*-anisílico, al igual que ocurre con las AAO de *P. pulmonarius* y *B. adusta*.

La AAO de *P. eryngii* es una flavoproteína de tipo oxidasa, perteneciente a la superfamilia de oxido-reductasas que contienen FAD como cofactor. Esta clase de flavoproteínas se caracteriza por presentar una estructura secundaria mixta con hélices- α y láminas- β (principalmente en disposición antiparalela). El dominio C-terminal de estas proteínas presenta una estructura *sandwich* $\alpha + \beta$ y en su dominio N-terminal se encuentra el motivo $\beta\alpha\beta$ de unión del FAD (Wierenga *et al.*, 1983). Pertenecen a esta superfamilia: la familia GMC de oxidorreductasas - glucosa oxidasa y deshidrogenasa (EC 1.1.99.10), metanol oxidasa (alcohol oxidasa; EC 1.1.3.13) y colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1) - la familia de la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, L-aminoácido oxidasa (EC 1.4.3.2) y poliamino oxidasa (EC 1.5.3.11), y las UDP-aminoácido galactopiranosas

mutasas (EC 5.4.99.9). La AAO de *P. eryngii* presentó una moderada homología de secuencia con la glucosa oxidasa de *A. niger*. Tomando como modelo de referencia la estructura molecular de esta oxidasa se obtuvo un modelo molecular para la AAO (PDB: 1QJN). El modelo presenta 15 hélices- α y 5 láminas- β en los dos dominios mencionados anteriormente para otras oxidasas.

6. Objetivos generales de este trabajo

El presente trabajo se inicia en el modelado por homología de la enzima AAO de *P. eryngii*, previamente clonada, secuenciada y expresada en forma heteróloga. Pretende ser una continuación de la caracterización de esta interesante oxidasa, profundizando en los aspectos más relevantes de sus propiedades estructurales y funcionales. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos: i) estudios de especificidad y búsqueda de nuevos sustratos; ii) mecanismos cinéticos de oxidación de diferentes sustratos mediante la técnica de *stopped-flow*; iii) análisis del modelo de la AAO obtenido por homología; iv) identificación mediante *docking* molecular de los residuos potencialmente implicados en la unión y oxidación de los sustratos; v) comprobación del papel de estos residuos mediante construcción de distintas variantes de la AAO por mutagénesis dirigida.

Materiales y métodos

1. Microorganismos y vectores plasmídicos

1.1. Cepas fúngicas

Las hongos usados en el presente trabajo fueron el ascomiceto, *E. nidulans* (familia Trichocomaceae; teleomorfo de *Aspergillus nidulans*) y el basidiomiceto *P. eryngii* (familia Lentinaceae) conservados en la colección de cultivos de hongos del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC. Las cepas utilizadas se indican a continuación.

- *E. nidulans* IFJM¹ A729: Cepa auxótrofa para biotina, metionina y arginina (*biA1*, *metG1*, *argB2*) cedida por el Dr. M.A. Peñalva (CIB, Madrid).
- *P. eryngii* IFJM A169: Cultivo obtenido a partir de un carpóforo (mercado de Madrid) (depositado como CBS² 613.91 y ATCC 90787).

1.2. Cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en la presente memoria se indican a continuación.

- DH5 α (Stratagene®): Genotipo SupE44, Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, th-1, relA1 (Hanahan, 1983).
- XL10-Gold (Stratagene®): Genotipo Tet^R Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 SupE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac^aZ Δ M15 Tn10 (Tel^R) Amy Cam^R] (Jerpseth *et al.*, 1997).
- W3110: cepa cedida por el Dr. A.T. Smith (University of Sussex, UK), que se utilizó como huésped de expresión de genes clonados en el plásmido pFLAG1.

1.3. Vectores

- pALCA1: Vector de expresión derivado de pBluescript, portador del promotor y secuencias reguladoras de la transcripción del gen *alcA* de *E. nidulans*. Este gen codifica para la alcohol deshidrogenasa, cuya expresión es inducible por diferentes compuestos, entre los que se encuentra la treonina y el etanol, y reprimible por glucosa (Lockington *et al.*, 1985).

¹ IFJM: colección de cultivos de hongos del CIB procedente del antiguo Instituto Jaime Ferrán de Microbiología.

² CBS: Centraalbureau vor Schimmelcultures.

Este plásmido presenta el terminador transcripcional del gen *trpC* de *E. nidulans* y como marcador de selección el gen *argB*, que codifica para la ornitina carboximetiltransferasa implicada en la biosíntesis de arginina. Este plásmido fue cedido por el Dr. M.A Peñalva (CIB, Madrid) (Fernández-Cañón y Peñalva, 1995). En este vector se clonó el cDNA de la AAO de *P. eryngii* (ver GenBank AFO64069).

- **pFLAG1:** Vector de expresión de *E. coli*, derivado de pFLAG, portador del promotor *tac* y del gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección. El promotor *tac* es un híbrido entre los promotores *trp* y *lac* inducible por IPTG³ (un análogo no hidrolizable de la lactosa).

2. Medios de cultivo

A continuación se describen los distintos medios de cultivo empleados, tanto sólidos como líquidos.

2.1. Medios de cultivo para hongos

Agar malta

Este medio se empleó para el mantenimiento de los hongos utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Agar malta

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Extracto de malta	20
Agar	20

Medio Czapek-Dox (modificado)

Este medio se utilizó para la producción de AAO en cultivos de *P. eryngii*. Su composición se muestra en la Tabla 2.

³ IPTG: isopropil tio-β-D-galactósido

Tabla 2. Medio Czapek-Dox

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Glucosa	10
Tartrato amónico	2
Extracto de levadura (Difco)	1
KH ₂ PO ₄	1
KCl	1
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.5
	<i>mL/L</i>
Elementos traza (Tabla 3)	10

Tabla 3. Elementos traza

<i>Componentes</i>	<i>mg/L</i>
Na ₂ B ₄ O ₇ 10 H ₂ O	100
CuSO ₄ 5 H ₂ O	10
Fe ₂ (SO ₄) ₃ 7H ₂ O	50
MnSO ₄ 4H ₂ O	10
ZnSO ₄ 7H ₂ O	70
NH ₄ MoO ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	10

Ajustar a pH 5.5 con HCl y esterilizar en autoclave a 110°C durante 30 min.

Medio mínimo

Este medio se ha empleado como medio de crecimiento de *E. nidulans* para la obtención de micelio. También se ha utilizado para la obtención de esporas suplementado con un 1% de agar.

Tabla 4. Medio mínimo

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Glucosa	10
Tartrato amónico	0.92
	<i>mL/L</i>
Solución de sales (Tabla 5)	20

Ajustar a pH 6.8 con NaOH y esterilizar en autoclave a 110°C durante 30 min. Para los medios de cultivo sólidos, añadir agar al 1%. La solución de

L-arginina debe ser adicionada al medio autoclavado, tras ser esterilizada por filtración.

Tabla 5. Solución de sales

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
KCl	26
MgSO ₄ 7H ₂ O	26
KH ₂ PO ₄	76
	<i>mL/L</i>
Elementos traza (Tabla 6)	50

Tabla 6. Elementos traza

<i>Componentes</i>	<i>mg/L</i>
Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O	40
CuSO ₄ 5H ₂ O	400
Fe ₂ (SO ₄) ₃ H ₂ O	800
Na ₂ MoO ₄ H ₂ O	800
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8

Las soluciones de elementos traza y sales se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 min.

Para la cepa *E. nidulans* *biA1*, *metG1*, *argB2* hay que añadir al medio los requerimientos específicos indicados en la Tabla M7.

Tabla 7. Requerimientos específicos

<i>Componentes</i>	<i>mL/L</i>
D-Biotina 100 mg/L	10
L-Metionina 14.9 g/L	5
L-Arginina 53 g/L	10

Medio de inducción para la AAO expresada en *E. nidulans*

Es el medio mínimo descrito en el apartado anterior suplementado con D-biotina y L-metionina a las concentraciones indicadas (la cepa *E. nidulans* *biA1*, *metG1*, *argB2* transformada no requiere arginina), al que se le adiciona como inductor treonina a una concentración 100 mM.

Medio completo

Este medio se utilizó fundamentalmente como medio sólido para la obtención de esporas de *E. nidulans* y su mantenimiento.

Tabla 8. Medio completo

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Glucosa	10
Peptona	2
Extracto de levadura	1
	<i>mL/L</i>
Solución de sales 50x (Tabla 7)	20
D-Biotina 100 mg/L	10
L-Metionina 14.9 g/L	5
Solución de casaminoácidos 150 g/L	10

Ajustar a pH 6.8 con NaOH y autoclavar a 110°C durante 30 min. A continuación añadir 10 mL de la solución de vitaminas (Tabla 9). Para cultivo en medio sólido añadir agar al 1%.

Tabla 9. Solución de vitaminas

<i>Componentes</i>	<i>mg/L</i>
Tiamina HCl	50
Biotina	10
Ácido nicotínico	100
D-Pantotenato de calcio	200
Piridoxina HCl	50
Riboflavina	100
PABA	100

2.2. Medios de cultivo para bacterias

Los medios de cultivo utilizados son los descritos en Sambrook y Russell (2001).

Medio LB

Fué el medio líquido empleado para el mantenimiento y propagación de *E. coli*. También se utilizó en forma sólida tras añadir agar (20 g/L).

Tabla 10. Medio LB

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio ψ broth

Este medio se utilizó como medio de crecimiento de *E. coli* en la obtención y preparación de células competentes.

Tabla 11. Medio ψ broth

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Peptona	20
MgSO ₄ 7H ₂ O	4
Extracto de levadura	5
KCl	7.5

El medio se ajusta a pH 7.6 con KOH y se esteriliza en autoclave a 110°C durante 30 min. Es aconsejable conservarlo a temperatura ambiente (a 4°C el MgSO₄ precipita).

Medio *terrific broth* (TB)

Medio enriquecido y tamponado utilizado para el crecimiento de la cepa de *E. coli* W3110 transformada con el plásmido pFLAG1 con el inserto del gen de AAO. Este medio incrementa el rendimiento de DNA plasmídico a partir de cultivos transformados de *E. coli*.

Tabla 12. Medio TB

Componentes	g/L
Triptona	12
Extracto de levadura	24
	mL/L
Glicerol	4

Para su preparación se añaden 900 mL de agua destilada y se esteriliza en autoclave durante 20 min a 121°C. En el momento de ser utilizado se suplementa con 100 mL de una solución 170 mM de KH_2PO_4 y 720 mM de KHPO_4 (previamente esterilizada bajo las mismas condiciones del medio).

3. Mantenimiento y cultivo de los microorganismos

3.1. Mantenimiento de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se mantuvieron mediante resiembras periódicas en placas de agar LB. Los medios inoculados se incubaron a 37°C durante 24 h. Para conservar las bacterias durante tiempos prolongados, se realizaron cultivos líquidos que fueron centrifugados a 8000 rpm durante 5 min y el precipitado resuspendido en LB con glicerol al 20% (todo ello bajo condiciones de esterilidad). Alícuotas de 200 μL en tubos Eppendorf estériles se conservaron a -80°C.

3.2. Cultivo de *E. coli*

Los cultivos líquidos de *E. coli* para la obtención de biomasa se realizaron en medio LB a 37°C y 150 rpm, durante toda la noche. El volumen del medio de cultivo respetaba la relación de un 20% (v/v) respecto al volumen del matraz o tubo de incubación. Los cultivos en medio sólido se realizaron en agar LB.

3.3. Mantenimiento de las cepas fúngicas

Para el mantenimiento de las cepas de *E. nidulans* y *P. eryngii* se realizaron resiembras periódicas utilizando, respectivamente, medio mínimo con biotina y metionina (y arginina en el caso de la cepa de *E. nidulans* sin

transformar) y agar malta. Las placas, una vez inoculadas se incubaron a 37°C durante 4 días con el fin de obtener un buen crecimiento y esporulación en el caso de *E. nidulans*. Las placas crecidas, previamente precintadas, se conservaron a 4°C.

Para el mantenimiento de las cepas durante tiempos prolongados, se utilizaron tubos inclinados de agar malta para *P. eryngii* o de medio mínimo (con los requerimientos mencionados anteriormente) para *E. nidulans* a los que se adicionó un acaricida (Dieldrin, 40 µg/mL) y un antibiótico (cloranfenicol, 12 µg/mL) para impedir el crecimiento de ácaros y bacterias respectivamente. En el caso de *P. eryngii* también se adicionó benomilo (Benlate, 3 mg/mL) que impide la proliferación de hongos contaminante de tipo ascomiceto. En el caso de *E. nidulans* también se conservaron conidios (esporas asexuales) en glicerol. Este método consiste en añadir 5 mL de agua estéril con Tween 80 al 0.01%, a las placas esporuladas. Se rascan las esporas con la ayuda de un asa de siembra, y el volumen recuperado se centrifuga en tubos Eppendorf estériles a 8000 rpm durante 5 min, descartándose el sobrenadante. Las esporas se resuspenden en glicerol estéril al 20% y se almacenan a -20°C.

3.4. Cultivo de *P. eryngii*

3.4.1. Obtención de inóculos

Como inóculo se utilizó micelio homogenizado obtenido de cultivos del hongo en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio Czapek-Dox, que fueron inoculados con un fragmento de cultivo en placa de agar malta, e incubados a 28°C y 180 rpm. Una vez crecido el micelio (3-6 días) fue triturado bajo condiciones asépticas en una batidora (Mod. 50/60 CY Sorvall Omni-Mixer) durante unos 20 s a la mínima velocidad. El inóculo se preparó en un 5% del volumen de medio a inocular, ajustando en peso seco a una concentración final de 1 mg/mL.

3.4.2. Producción de AAO

Para la producción de AAO se realizaron cultivos en matraces de 1 L con 250 mL de medio Czapek-Dox, que fueron inoculados como se describe en el apartado anterior e incubados a 28°C y 180 rpm durante 6 días.

4. Determinaciones analíticas

4.1. Determinación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas siguiendo el método descrito por Bradford (1976) utilizando el *Bio-Rad Protein Assay*. Este método se basa en el cambio de absorbancia de 465 a 595 nm que experimenta una solución de Coomassie Blue G-250 al unirse a las proteínas.

Procedimiento: A 20 μL de muestra problema se añade 1 mL del reactivo diluido (1:4) en agua pentadestilada. La mezcla se agita por inversión y se determina espectofotométricamente su absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas en las muestras se cuantifica usando como referencia una curva patrón entre 0 y 1 mg/mL de albúmina de suero bovina (BSA).

4.2. Cálculo de coeficientes de extinción molar

4.2.1. Coeficientes de extinción molar de aldehídos

Para los estudios de especificidad de la AAO* fue necesario calcular los coeficientes de extinción molar (ϵ) de los aldehídos formados como productos de oxidación de los alcoholes ensayados. El cálculo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones experimentales utilizadas para el estudio de la actividad AAO con los sustratos objeto de análisis.

Procedimiento: Se prepararon soluciones 1 mM en tampón fosfato 100 mM, pH 6, de los aldehídos y sus correspondientes alcoholes. Tras obtener los espectros de absorción UV (espectrofotómetro Shimadzu UV-160) de cada par aldehído-alcohol se eligió una longitud de onda (λ) de máxima absorbancia en el espectro diferencia aldehído-alcohol. Para todos los sustratos utilizados la absorbancia del alcohol fue despreciable a dicha λ (en el caso de que hubiese varios máximos de absorción se eligió la λ mas cercana a la región visible del espectro). Una vez seleccionada la λ , se prepararon las diluciones apropiadas de cada aldehído y se midieron los respectivos valores de absorbancia. A partir de estas medidas se determinó ϵ , según la ecuación $\epsilon = A \cdot c^{-1} \cdot l^{-1}$, donde (A) es la absorbancia correspondiente

a una concentración (c) molar de la sustancia a través de un paso óptico (l) en cm.

4.2.2. Coeficiente de extinción molar de la AAO

El coeficiente de extinción molar de la enzima AAO* expresada en *E. nidulans* se determinó a 463 nm, longitud de onda correspondiente a unos de los máximos del espectro del FAD presente en esta flavoproteína (Chapman y Reid, 1999).

Procedimiento: Se obtuvo el espectro de absorción en el visible de la muestra de AAO, midiendo su máximo de absorbancia a 463 nm (ΔA_{AAO}). Dicha muestra, en un vial de 1,5 mL de cierre hermético y cubierto con un papel de aluminio, fue calentada a 80°C durante 5 min. Tras centrifugación a temperatura ambiente, la apoproteína precipitada queda separada del cofactor, con máximo de absorbancia a 450 nm (ΔA_{FAD}). Como la concentración es la misma, la razón de absorbancias de la proteína y su grupo prostético es igual (según la ley de Lambert-Beer) a la de sus coeficientes de extinción, atendiendo a la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta A_{AAO}}{\epsilon_{AAO_{463nm}}} = \frac{\Delta A_{FAD}}{\epsilon_{FAD_{450nm}}} \quad \epsilon_{FAD_{450nm}} : \text{es } 12.25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

4.3. Determinación de la actividad AAO

La actividad AAO se evaluó en base a la cantidad de aldehído que la enzima es capaz de liberar a partir de la oxidación de un determinado alcohol.

4.3.1. Definición de unidad enzimática

Una unidad de actividad AAO se definió como la cantidad de enzima necesaria para transformar un μmol de sustrato por minuto, en nuestro caso para liberar μmol de aldehído bajo las condiciones de reacción ensayadas.

4.3.2. Estimación espectrofotométrica

Se determinó la producción de aldehído como el incremento lineal de absorbancia durante un minuto para una determinada longitud de onda, la cual fue seleccionada en función de los espectros de los sustratos y sus respectivos productos. El espectrofotómetro utilizado fue un Shimadzu UV-160A.

Sustrato empleado

Mientras no se indique lo contrario, la actividad AAO se determinó utilizando alcohol veratrílico en tampón fosfato 100 mM de pH 6.

Procedimiento de valoración

La reacción se realizó en cubetas de cuarzo de 1 mL que contenían alcohol veratrílico a una concentración final 8 mM y la apropiada dilución de la flavoproteína en tampón 100 mM de pH 6, ajustada a un volumen final de 1 mL. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C) monitorizándose el incremento de absorbancia durante 1 min a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Guillén *et al.*, 1992).

5. Métodos de análisis de ácidos nucleicos

5.1. Reactivos específicos

5.1.1. Ácidos nucleicos

El DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III (Marcador II) y el *DNA Molecular Weight Marker VII* (usados como marcadores de tamaños en los geles de electroforesis de DNA) fueron adquiridos a Boehringer Mannheim.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores (*primers*) en los experimentos de análisis de secuencias de DNA, así como los demás oligonucleótidos utilizados a lo largo de esta memoria fueron sintetizados en el servicio de Química de Proteínas del CIB, con un equipo de

Pharmacia LKB (Gene Assembler Plus) (Narang, 1987). Las secuencias de los cebadores utilizados se indican a continuación:

Cebador AAOper1 directo: 5' -ATGTCGTTTGGTGCACTTCG-3'

Cebador AAOper2 directo: 5' -GGATCAACAGAAGATTTCG-3'

Cebador AAOper3 directo: 5' -GTTGTTCTTTCGGCGGG-3'

Cebador AAOper4 directo: 5' -GCCGCTCATCAATCCGC-3'

Cebador AAOper5 directo: 5' -CCCTTCGCGGCCCAACGCAC-3'

Cebador AAOpercr1 reverso: 5' -CTACTGATCAGCCTTG-3'

Cebador AAOpercr2 reverso: 5' -GGATCATGGTGAAGATGTCG-3'

Cebador AAOpercr3 reverso: 5' -CGCTAGGATTGTTAACGATGG-3'

Cebador AAOpercr4 reverso: 5' -CCTGACGAAGCTGCTGGATATTG-3'

Cebador AAOpercr5 reverso: 5' -CCCCGACGACAACGTAGTC-3'

Para el cálculo de su concentración se midió la absorbancia a 260 nm (una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 20 µg/mL). Para su conservación se guardaron a -20°C.

5.1.2. Antibióticos

La ampicilina utilizada fue adquirida en forma del preparado farmacéutico a Boehringer.

5.1.3. Enzimas de restricción yificadoras

La enzima BioTaq® polimerasa, Turbo Pfu® polimerasa y Dpn I fueron adquiridas a Stratagene®. También fueron suministradas por Stratagene® las enzimas de restricción EcoRI y SmaI. La RNasa A de páncreas bovino fue comprada a Boehringer. Las enzimas líticas utilizadas en la obtención de protoplastos, Novozyme 234 y Glucanex, fueron adquiridas a Novo Nordisk Ferment Ltd.

5.2. Obtención y purificación de ácidos nucleicos

5.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

La extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli* en medio líquido LB con ampicilina (100 µg/mL). La purificación se realizó a pequeña escala, partiendo de un volumen de cultivo de 1 a 3 mL y

utilizando el *kit Wizard Minipreps DNA Purification System* (Promega). El protocolo utilizado fue el que se especifica en el manual de instrucciones.

5.2.2. Cuantificación y estimación de la pureza

La cuantificación del DNA y estimación de su pureza se llevó a cabo espectrofotométricamente a partir de las absorbancias a 260 y 280 nm. Una unidad de absorbancia a 260 nm es equivalente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA.

Por otro lado, el cociente A_{260}/A_{280} da una idea de la calidad del DNA, un valor menor de 1.8 indica contaminación con proteínas y valores superiores a 2 indican posible contaminación con cloroformo o fenol. En ambos casos es aconsejable precipitar nuevamente el DNA.

5.2.3. Digestión y modificación del DNA

Las digestiones del DNA con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo según las indicaciones de Sambrook y Russell (2001). Generalmente, se incubaron de 100 a 200 ng de DNA con 2 a 5 unidades de la enzima a 37°C durante 1 h, en presencia del tampón recomendado por las casas comerciales.

5.3. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% o 1.5% en tampón TAE⁴, conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 1.2 μM (Sambrook y Russell, 2001). La muestra se mezcló con el tampón de carga⁵ en una relación 1:9, y el potencial aplicado fue de 50-120 voltios.

Las bandas de DNA se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador UV (mod. TVL-312A Vilver Laurmat). Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron por comparación con marcadores de distintos números de pares de bases. Cuando se requirió fotografiar los geles se utilizó una cámara Polaroid con un filtro naranja y películas Polaroid de tipo 667.

⁴ TAE: Tris-acetato 40 mM pH 8 y EDTA 1 mM.

⁵ Tampón de carga: glicerol al 50%, azul de bromofenol 0.1%, azul de xilencianol 0.1% y EDTA 50 mM de pH 8.

5.4. Secuenciación del DNA

Las secuencias fueron realizadas por el Servicio de Secuenciación del CIB. Las reacciones de secuencia se resolvieron mediante electroforesis a 1680 V y 50 mA en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 4%, en un secuenciador automático (ABI PRISM® 377 DNA Sequencer). Los fluoróforos emiten señales a distintas longitudes de onda, que se recogen y transforman directamente en la secuencia.

6. Expresión heteróloga

6.1. Expresión en *E. nidulans*

6.1.1. Vector de expresión

El cDNA de la AAO de *P. eryngii*, incluyendo su péptido señal, se clonó en el vector pALCA1 en el sitio SmaI, dando lugar al plásmido de expresión pALAAO. Para ello, la secuencia completa se amplificó previamente por PCR mediante dos cebadores correspondientes al C-terminal y N-terminal de la proteína (EACt y ENt respectivamente) (Varela *et al.*, 2001).

ENt: 5'-ATGTCGTTTGGTGCACTT-3'

EACt: 5'-CCCTACTGATCAGCC-3'

6.1.2. Transformación de *E. nidulans*

Para la transformación de *E. nidulans* se obtuvieron protoplastos y se trataron con polietilenglicol y Ca^{2+} para favorecer la introducción de DNA foráneo en la célula. El protocolo utilizado para la obtención de protoplastos y transformación de los mismos fue el descrito por Fernández-Cañón y Peñalva (1995).

Los transformantes se seleccionaron por complementación de la mutación en el gen *argB* (que codifica la ornitina carboximetiltransferasa implicada en la biosíntesis de arginina) existente en *E. nidulans* IFJM A729 (*biA1*, *metG1*, *argB2*). Esta cepa sólo puede crecer en presencia de L-metionina, L-arginina, L-biotina. La complementación de la auxotrofía para

la arginina se realizó con el plásmido pALCA1 que contiene el gen *argB* de *E. nidulans*.

Obtención del micelio

Para el crecimiento de micelio se inocularon 250 mL de medio mínimo (suplementado con L-arginina, L-biotina, L-metionina) en un matraz de 1L con una solución de esporas de *E. nidulans* (*biA1*, *metG1*, *argB2*). Las esporas se obtuvieron de un cultivo en placa de dicha cepa en medio completo incubado durante 3 días a 37°C. El matraz inoculado se incubó a 30°C con una agitación de 200 rpm. Tras 16 h de incubación, el micelio se recuperó por filtración y se lavó con 100 mL de tampón de lavado⁶. El exceso de humedad del micelio se eliminó por absorción en papel de filtro.

Obtención de protoplastos

Se resuspendió 1 g de micelio en 10 mL de tampón de protoplastos frío (TP⁷) y se agitó con un vórtex para romper el micelio. Esta suspensión se llevó a un matraz estéril de 250 mL, al que se añadieron 20 mg de Novozyme 234 y 24 mg de BSA. La suspensión se incubó de 10 a 12 h en un baño a 30°C y 130 rpm, controlándose al microscopio la formación de protoplastos.

Los protoplastos obtenidos se diluyeron con TP hasta obtener un volumen final de unos 20 mL por gramo de micelio inicial. Se prepararon tubos Corex de 30 mL estériles con la solución colchón⁸ a una proporción 1:4 respecto al volumen de la suspensión de protoplastos, la cual se añadió dejándola deslizar con cuidado por debajo de la solución colchón.

Tras su centrifugación (10 min a 6000 rpm y 4°C), los protoplastos quedaron en la interfase formada, que se recogió cuidadosamente con una pipeta de 10 mL y pasó a otro Corex estéril. La solución se diluyó nuevamente, pero esta vez con 10-15 mL de ST⁹ en agitación continua para evitar el choque osmótico.

⁶ Tampón de lavado: MgSO₄ 0.6 M, NaH₂PO₄ 10 mM de pH 5.8.

⁷ Tampón de protoplastos: MgSO₄ 1.2 M, NaH₂PO₄ 10 mM de pH 5.8. Ajustar el pH a 5.8 con NaOH 1M.

⁸ Solución colchón: sorbitol 0.6M, Tris-HCl 0.1M de pH 7.5.

⁹ ST: Sorbitol 1M, Tris-HCl 0.1M de pH 7.5.

A continuación se centrifugó (10 min a 4000 rpm y 4°C), se retiró el sobrenadante y resuspendieron los protoplastos en ST (volumen final de 1 ml). Finalmente, los protoplastos pasaron a un vial de 1.5 mL, se centrifugaron durante 1 min (9000 rpm, a 4°C) y resuspendieron en 1 mL de STC¹⁰. Este paso se repitió dos 2 veces, obteniéndose finalmente una suspensión en 200 µL de STC, que se mantuvo en hielo hasta el momento de realizar la transformación.

Transformación

A los 200 µL de la suspensión de protoplastos se añadieron 1-10 µg de DNA (sin sobrepasar la relación 1:10 en volumen) y 50 µL de polietilenglicol (PEG¹¹) y se incubaron en hielo durante 20 min. Transcurrido este tiempo se añadió nuevamente 1 mL de PEG y se mantuvieron 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugaron (5 min a temperatura ambiente) eliminando el sobrenadante y resuspendiendo los protoplastos transformados en 200 µL de STC.

Extensión en placa

Se añadieron diluciones de la solución de protoplastos transformados a tubos con 3 mL de agar blando (mantenido líquido a 48°C). La mezcla se extendió sobre un medio mínimo con sacarosa 1 M, sin L-arginina. Las placas se incubaron a 37°C y, tras unas 72 h, se observó la aparición de colonias, las cuales fueron estriadas en nuevas placas de medio mínimo sin L-arginina. A partir de éstas se realizó un nuevo pase a medio completo (37°C) para obtener micelio crecido y esporulado.

6.1.3. Cultivo de la cepa *E. nidulans* transformada

Condiciones para la obtención de inóculos

Los inóculos de la cepa *E. nidulans* (*biA1*, *metG1*, *argB2*) transformada se prepararon a partir de una suspensión de esporas obtenida de placas de medio completo tras unos cuatro días de crecimiento. Para preparar la

¹⁰ STC: ST y Cl₂Ca 0.01 M.

¹¹ PEG: PEG 6000 60% (p/v), Tris-HCl 10 mM, Cl₂Ca 10 mM, pH 7.5 ajustado con HCl 1M.

suspensión de esporas se rascaron las placas esporuladas con la ayuda de un asa de siembra y se añadieron 5 mL de agua estéril con Tween 80 al 0.01%.

Condiciones para la producción de la AAO*

Para la producción de AAO* en *E. nidulans* se utilizaron matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 250 mL de medio mínimo (suplementado con metionina y biotina a las concentraciones que se indican en el apartado 2.1.1 de esta sección). Los matraces fueron inoculados con un solución de esporas ($5 \cdot 10^6$ esporas/mL de medio). Tras 24 h de crecimiento a 180 rpm y 28°C, el micelio fue filtrado y lavado con agua destilada estéril. El micelio lavado fue transferido a matraces Erlenmeyer de 1 L que contenían 250 mL de medio de inducción con treonina (ver apartado 3.11.4 de esta sección) e incubado a 180 rpm y 28 °C durante 48 horas.

6.2. Expresión en *E. coli*

6.2.1. Vector de expresión

El cDNA que codifica el gen de la AAO se amplificó por PCR, sin incluir los 27 aminoácidos que constituyen el péptido señal, utilizando los cebadores sintéticos AAONt y AAOcT que aparecen abajo, correspondientes respectivamente al C-terminal y N-terminal de la proteína (el fragmento incluye el triplete de terminación. El producto de PCR se clonó en el vector de expresión pFLAG1, entre las dianas *NdeI* y *BglII*, obteniéndose el vector pFLAG1AAO.

AAONt: 5' -GGGAATTCCATATGGCCGATTTTGACTACGTTGTCGTCGG-3'

AAOcT: 5' -GGAAGATCTCTACTGATCAGCCTTGATAAGATCGG-3'

6.2.2. Transformación y crecimiento de *E. coli* W3110

La construcción pFLAG1AAO se utilizó para transformar células de *E. coli* W3110, siguiendo el método descrito en Sambrook y Russell (2001).

A partir de una colonia de la cepa transformada cultivada en agar LB se inocularon matraces de 250 mL con 30 mL de medio LB, incubándose durante toda la noche a 37°C y 180 rpm.

A partir de los cultivos anteriores se inocularon matraces de 2 L que contenían 500 mL de medio TB con 12.5 mL de inóculo, incubándose a 37°C y 180 rpm hasta obtener una densidad óptica a 500 nm de 1. En ese momento, se añadió como inductor IPTG a una concentración final de 1 mM (la solución concentrada se esterilizó por filtración), incubándose durante 4 h bajo las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm durante 30 min descartándose el sobrenadante y conservándose a -80 °C el precipitado, que contenía la proteína inactiva en forma de cuerpos de inclusión.

6.2.3. Obtención y solubilización de cuerpos de inclusión

El precipitado celular previamente congelado se resuspendió en el menor volumen posible de solución de lisis¹². Una vez disuelto, se añadió lisozima (concentración final de 2 mg/mL) y, tras incubación en hielo durante 1 h, se adicionó DNasa. Transcurridos 30 min, las células se lisaron por sonicación y centrifugaron durante 30 min a 15000 rpm, descartándose el sobrenadante con restos celulares. El precipitado con los cuerpos de inclusión fue disuelto en la solución de lavado¹³, homogeneizado con un homogenizador (Jencon Uniform) y centrifugado (30 min a 15000 rpm). Este proceso de lavado se repitió tres veces. Los cuerpos de inclusión lavados se solubilizaron en la solución de desplegado¹⁴, que incluye condiciones fuertemente desnaturizantes por la presencia de la urea 8 M y DTT 5 mM. Tras centrifugación (30 min a 15000 rpm) se descartó el precipitado, quedándonos con el sobrenadante donde se encontraban las proteínas desnaturizadas disueltas.

6.2.4. Plegado *in vitro*

La solución de proteína desnaturizada se diluyó con la solución de plegado¹⁵ hasta obtener una concentración final de urea de 600 mM, con la que se obtuvo un óptimo de proteína plegada (Ruiz-Deñás *et al.*, 2004). La

¹² Solución de lisis: Tris HCl 50 mM de pH 8, EDTA 10 mM y DTT 5 mM.

¹³ Solución de lavado: Tris HCl 20 mM de pH 8, EDTA 1 mM, DTT 5 mM.

¹⁴ Solución de desplegado: Tris HCl 20 mM de pH 8, EDTA 2 mM, DTT 5 mM y urea 8 M.

¹⁵ Solución de plegado: Tris HCl 20 mM de pH 9, glutatión oxidado 2.5 mM, glicerol al 40%, DTT 1 mM y FAD 0.02 mM.

solución de plegado fue mantenida en oscuridad a 4°C durante 5 a 7 días, alcanzándose tras este periodo un máximo de actividad AAO (medida frente a alcohol veratrílico).

7. Purificación de la AAO

7.1. Purificación de la AAO salvaje y recombinante

Tanto la AAO recombinante expresada en *E. nidulans* como las distintas variantes obtenidas por mutagénesis dirigida, se purificaron utilizando básicamente el protocolo descrito por Guillén *et al.* (1992) para la purificación de la AAO salvaje (no recombinante) producida por *P. eryngii*.

7.1.1. Filtración y concentración

Tras 48 h de incubación en el medio de inducción con treonina, el cultivo fue filtrado a través de papel Whatman nº 1. El crudo enzimático fue concentrado por filtración tangencial con membranas de 3 kDa (Membrane Cassette de Filtron) con una bomba peristáltica (modelo 7518-02 de Masterflex). Para volúmenes pequeños (fracciones de columnas cromatográficas) se utilizaron cartuchos de ultrafiltración de 5 kDa (Millipore) y Nanosep (Pall Life Sciences) que fueron centrifugados a 6500 rpm y 4°C.

Para terminar de reducir el volumen del concentrado enzimático se utilizó diálisis en sacarosa. Las proteínas se concentraron en bolsas de diálisis de celulosa de 12-14 kDa (Spectrum).

7.1.2. Cromatografía de exclusión molecular

Baja eficacia

Esta técnica se utilizó en el primer paso de purificación del concentrado enzimático. Para ello se prepararon columnas XK 26/100 con Sephacryl[®] S-200 (Pharmacia Biotech) como fase estacionaria. A la columna previamente equilibrada con tampón tartrato 10 mM de pH 3 se le aplicó un volumen de muestra de 5 mL, y se recogieron fracciones de 6 mL utilizando un colector de fracciones y flujo por gravedad. Para el lavado de la columna se utilizó

NaCl 500 mM. En todas las fracciones se analizó la presencia de AAO* mediante medidas de la absorbancia a 465 nm (máximo de absorción de FAD-AAO) y la actividad enzimática sobre alcohol veratrílico.

Alta eficacia

Esta técnica se utilizó tras la cromatografía en MonoQ (apartado 7.1.3) cuando los estudios posteriores a realizar así lo requerían, por ejemplo para el cálculo de su coeficiente de extinción o el peso molecular. Se utilizó una columna Sephadex® 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech). El equipo cromatográfico empleado fue un HPLC AKTA® (Pharmacia Biotech) que consta de un inyector, dos bombas de gradiente, un detector UV-visible y un colector de fracciones. Se inyectó un volumen de muestra de 200 μ L y se eluyó con tampón fosfato 10 mM de pH 6, con 150 mM de NaCl, utilizando un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones recogidas fueron de 1 mL, monitorizándose la elución de las proteínas a 280 nm y la presencia de AAO* a 465 nm.

7.1.3. Cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia

Esta técnica cromatográfica de alta eficacia se utilizó como último paso de purificación de la AAO con las muestras procedentes de la columna de Sephacryl® S-200. La columna utilizada fue una Mono Q® HR 5/5 (Pharmacia Biotech) en el equipo cromatográfico descrito en el apartado anterior. A la columna previamente equilibrada con tampón fosfato 10 mM de pH 5.5 se aplicó un volumen de muestra de 1 mL. Para la purificación de la AAO* se aplicó un gradiente formado por el mismo tampón de equilibrado (solución A) y diferentes proporciones del mismo tampón suplementado con NaCl 0.5 M (solución B). El porcentaje de B se muestra en la Tabla 13. Las fracciones recogidas fueron de 1 mL, monitorizándose la absorbancia a 280 y 465 nm. En las fracciones con absorbancia a 465 nm se valoró la actividad AAO utilizando alcohol veratrílico como sustrato.

Para la separación de las distintas formas de AAO observadas tras expresión en *E. nidulans* (apartado 1.1.3 de Resultados) se utilizó el programa de separación descrito en la Tabla 14 utilizando como solución B tampón fosfato 10 mM de pH 5.5 suplementado con NaCl 0.2 mM

Tabla 13. Programa para la purificación de la AAO* de *E. nidulans* mediante intercambio iónico (las soluciones A y B se indican anteriormente).

<i>Tiempo (min)</i>	<i>% B</i>	<i>Flujo (mL/min)</i>
0	0	1
5	0	1
21	50	1
22	100	1
24	0	1
28	0	1

Tabla 14. Programa de separación de las distintas formas de AAO* de *E. nidulans*.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>% B</i>	<i>Flujo (ml/min)</i>
0	30	1
5	30	1
95	50	1
96	100	1
97	30	1
98	30	1

7.2. Purificación de la AAO* de *E. coli*

La AAO* de *E. coli* se purificó tras un único paso cromatográfico tal como se detalla a continuación.

7.2.1. Filtración y concentración

Para concentrar la solución de proteínas renaturalizadas tras su replegado durante 7-10 días se utilizó filtración tangencial tal y como se describió en el apartado 7.1.2.

7.2.2 Cromatografía de intercambio iónico

Para purificar la AAO* de *E. coli* se utilizó una columna de intercambio iónico Resource® Q de 6 mL (Amersham Biosciences) tras filtración y concentración. A la columna previamente equilibrada con tampón fosfato 10 mM de pH 5.5, se aplicó un volumen de muestra de 3-5 mL. El tampón que se utilizó para separar las proteínas fue el mismo de equilibrado (solución A) suplementado con NaCl 0.5 M (solución B). El programa de separación es el que se muestra en la siguiente (Tabla 15).

Se recogieron fracciones de 1 mL, monitorizándose la absorbancia a 280 y 465 nm. En las fracciones con absorbancia a 465 nm se valoró la actividad AAO utilizando alcohol veratrílico como sustrato.

Tabla 15. Programa para la purificación de la AAO* de *E. coli* mediante intercambio iónico (las soluciones A y B se indican anteriormente).

Tiempo (min)	% B	Flujo (mL/min)
0	0	1
12	0	1
19	50	1
22	100	1
27	100	1
33	0	1

7.3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Los geles desnaturalizantes se realizaron con poliacrilamida al 7.5 %, conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS) según el método de Laemmli (1970). La electroforesis se llevaron a cabo en un sistema Mini Protean II (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante.

7.3.1. Preparación del gel

Cada gel estaba constituido por dos partes, el gel concentrador al 6 % en la parte superior y el gel separador al 7.5 % en el resto. La composición de ambas partes se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Composición del gel usado en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

<i>Gel concentrador</i>	<i>volumen</i>
Tampón A ¹⁶	1.25 mL
Acrilamida/bisacrilamida (30%/0.8%)	0.75 mL
TEMED ¹⁷	5 µL
Persulfato de amonio 10%	20 µL
Agua destilada	3.25 mL
<i>Gel separador</i>	<i>volumen</i>
Tampón B ¹⁸	1.28 mL
Acrilamida/bisacrilamida (30%/0.8%)	1.79 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amonio 10%	15 µL
Glicerol 50%	104 µL
Agua destilada	2.43 mL

7.3.2. Realización de las electroforesis

Las muestras (hasta 25 µg) se diluyeron en el tampón de carga en la relación 2:1. La composición del tampón de carga se muestra en la Tabla 17. Antes de ser aplicadas en los geles, se hirvieron las muestras durante 5 min para provocar la desnaturalización completa de las proteínas.

Tabla 17. Composición del tampón de carga

<i>Componentes</i>	
Tris base 0.5 M pH 6.8	3.75 mL
Glicerol 87%	3.45 mL
β-mercaptoetanol	1.5 mL
Dodecil sulfato sódico (SDS)	0.9 g
Azul de bromofenol 0.8%	1 mL
Agua destilada	1.67 mL

¹⁶Tampón A: Tris base 0.5 M de pH 6.8 y SDS al 0.4%.

¹⁷TEMED: N,N',N'-tetrametiletilendiamina

¹⁸Tampón B: Tris base 3 M, pH 8, y SDS al 0.4%

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes con tampón de electroforesis¹⁹ con SDS y una corriente constante de 30 mA por gel.

7.3.3. Tinción de proteínas

La tinción de proteínas se llevó a cabo tras lavado con agua destilada para eliminar los restos de SDS. La tinción se realizó sumergiendo el gel durante 30 min en una solución de metanol, agua y ácido acético (50:40:10) con 0.25% (w/v) de azul de *Coomassie* R-250 (Sigma). Una vez transcurrido el tiempo de tinción, se retiró la solución y se decoloró el gel añadiendo ácido acético al 10%. Esta solución se reemplazó varias veces hasta que se visualizaron las bandas de proteínas.

8. Caracterización de la AAO* de *E. nidulans* y *E. coli*

8.1. Determinación de características físico-químicas

8.1.1. Temperatura óptima

Para determinar la temperatura óptima de la AAO* purificada se midieron las velocidades iniciales de reacción (incremento lineal de absorbancia) a distintas temperatura en un rango de 25 a 65°C utilizando como sustrato alcohol veratrílico bajo las condiciones habituales de reacción.

8.1.2. pH óptimo

El tampón utilizado fue citrato-fosfato-borato por el amplio rango de valores de pH sobre los que ejerce una buena capacidad amortiguadora. La enzima purificada se dializó frente a tampón citrato-fosfato-borato 10 mM de pH 5, y se estimaron las velocidades iniciales de reacción (incremento lineal de absorbancia) en un rango de pH entre 2-12. El sustrato (alcohol veratrílico) se preparó a una concentración 8 mM en tampón citrato-fosfato-borato 100 mM de los distintos pH a valorar (la cantidad de enzima añadida fue de 20 µL/mL de mezcla de reacción).

¹⁹ Tampón de electroforesis: Tris base 0.25 M, glicina 1.92 M, ajustar a pH 8.3 y añadir SDS al 1%

8.1.3. Estabilidad al pH

Para determinar la estabilidad al pH, 20 μ L de enzima purificada dializada frente a tampón citrato-fosfato-borato 10 mM de pH 5 se añadieron a 1 mL del mismo tampón a los distintos pH a determinar su estabilidad. Tras 24 h a 25°C se valoró la actividad frente a alcohol veratrílico en tampón citrato-fosfato-borato 100 mM de pH 5.

8.1.4. Estabilidad a la temperatura

La estabilidad de la enzima a la temperatura se determinó incubando durante 50 min la enzima purificada en tampón fosfato 100 mM, pH 5, a distintas temperaturas en un rango de 55 a 75°C. La actividad AAO residual se midió con alcohol veratrílico en tampón fosfato 100 mM, pH 5, a temperatura ambiente.

8.1.5. Masa molecular

La masa molecular de la AAO de *P. eryngii* y sus formas recombinantes expresadas en *E. nidulans* y *E.coli* se determinó por espectrometría de masas en un equipo MALDI-TOF Biflex de Bruker. Estos análisis fueron realizados en el servicio de cromatografía del CIB.

8.2. Determinación del grado y tipo de glicosilación

Tanto la enzima salvaje purificada de *P. eryngii* como recombinante expresada en *E. nidulans* fueron desglicosiladas (en condiciones nativas) para determinar el grado de glicosilación. En las reacciones de desglicosilación se utilizaron endo- β -N-acetilglucosaminidasa (Endo H de Boehringer-Mannheim) y N-glicosidasa F* (Roche). Ambas enzimas liberan los oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídico. Para ello hidrolizan el enlace entre los dos restos de N-acetilglucosamina unidos a la asparagina de la proteína (endo-glucosaminidasa) o entre la primera N-acetilglucosamina y la asparagina (N-glicosidasa) (Tarentino y Maley, 1974). Además se utilizó O-glicosidasa (Roche) que libera los oligosacáridos unidos por enlace O-glicosídico al hidrolizar el enlace entre N-acetilgalactosamina y los residuos de serina o treonina de la proteína.

Las reacciones se realizaron con cada una de las desglucosidasas por separado, utilizando tampón fosfato 20 mM, pH 7.2. Para 10 µg de glicoproteína en un volumen de 100 µL se añadieron 2 U de N-glicosidasa F*, 2 mU O-glicosidasa o 10 mU de Endo H. Las proteínas desglucosiladas fueron analizadas por espectrometría de masas de MALDI-TOF tal como se describe en el apartado anterior.

8.3. Determinación de la secuencia N-terminal

La secuencia del extremo N-terminal de la AAO* fue obtenida por degradación automatizada de Edman, de una muestra de 5 µg de proteína purificada, en un secuenciador Applied Biosystems (Perkin Elmer, modelo Procise® 494), trabajando en modo líquido, con un detector *on-line* de feniltiohidantoina (modelo 140C). Estos análisis fueron realizados en el servicio de química de proteínas del CIB.

8.4. Propiedades espectrofotométricas

Los espectros de absorción de la enzima nativa y las distintas variantes se llevaron a cabo en un espectrofotómetro HP 8453 UV-visible Hewlett Packard, salvo que se indique lo contrario.

8.4.1. Espectro de absorción FAD-AAO

Los espectros de absorción UV/VIS fueron obtenidos en tampón fosfato 10 mM, pH 6. Los barridos se hicieron en el rango de 300 nm a 550 nm. La concentración de enzima utilizada fue calculada usando el coeficiente de extinción molar de la AAO-FAD previamente calculado ($\epsilon_{463} = 10280$ y $11050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para las enzimas de *E. nidulans* y *E. coli* respectivamente). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, usando cubetas de cuarzo de 1 mL con 1 cm de paso óptico.

8.4.2. Reducción de la AAO con ditionito

Los espectros de reducción de la enzima oxidada se realizaron en condiciones anaeróbicas. Para ello se desplazó el oxígeno de todas las soluciones mediante ciclos alternos de vacío y argón de 10 min cada uno (este proceso fue repetido varias veces). La evacuación del oxígeno de la

solución de enzima, previamente dializada en tampón fosfato 10 mM de pH 6, se realizó directamente en una cubeta cerrada (Hellma) a la que se aplicó vacío y argón a través de un cierre de teflón. A continuación, la enzima fue titulada con diferentes concentraciones de una solución stock anaerobia de ditionito sódico 250 mM en tampón fosfato 100 mM, pH 6, añadida en condiciones anaeróbicas con una microjeringa (Hamilton) de 10 μ L.

8.4.3. Reactividad de la AAO con sulfito

Para realizar este ensayo se utilizó una muestra de AAO purificada y dializada frente a tampón fosfato 10 mM, pH 7, que fue titulada con diferentes concentraciones de una solución 1 M de sulfito sódico en tampón fosfato 100 mM, pH 7.

8.4.4. Reducción de la AAO con alcohol anisílico

La reducción enzimática de la AAO en su forma oxidada se realizó utilizando alcohol anisílico como sustrato. Para ello se utilizó una solución stock de alcohol 16 mM en tampón fosfato 100 mM, pH 6. El experimento se llevó a cabo en condiciones anaeróbicas, tal como se describe en el apartado 8.4.2. Para eliminar las posibles trazas de oxígeno en las soluciones se añadieron glucosa oxidasa comercial (10 U por 0.8 mL de reacción, de Sigma-Aldrich) y glucosa (310 mM concentración final).

8.4.5. Fotorreducción

El ensayo de fotorreducción se realizó bajo condiciones anaeróbicas en tampón fosfato 100 mM, pH 6 y 9, en presencia de EDTA 1 mM y 5-deazaribloflavina, tal como describen Medina et al. (1998). Con objeto de realizar el experimento en las condiciones de anaerobiosis más estrictas, se utilizó una cubeta de cuarzo diseñada para trabajar en ausencia de oxígeno, a la que se aplicaron ciclos sucesivos de vacío y argón en un tren de anaerobiosis. Los espectros se realizaron en un espectrofotómetro 942 Kontron Uvikon, tras distintos tiempos de exposición directa de la muestra a la luz de una lámpara de 50 W. Estas medidas se realizaron en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza.

8.5. Caracterización cinética

8.5.1. Especificidad de sustrato

8.5.1.1. Sustratos empleados

Tal como se indica a continuación, todos los compuestos utilizados fueron comerciales con la excepción del alcohol 3-cloro-*p*-anisílico.

Alcoholes: *p*-fluorobencílico y *m*-fluorobencílico de Flurochem, *p*-clorobencílico, *m*-clorobencílico, cinamílico, bencílico, veratrílico, *m*-anisílico y 2,4-hexadien-1-ol de Aldrich, *p*-metoxibencílico (*p*-anisílico) de Fluka, y 3-cloro-*p*-anisílico proporcionado por el Dr. Ed de Jong (Universidad de Wageningen).

Aldehído: *p*-fluorobenzaldehído de Fluorochem.

Ácido: ácido *p*-hidroximetilbenzoico (alcohol *p*-carboxibencílico) de Fluka.

8.5.1.2. Constante cinéticas de estado estacionario

Estos ensayos se realizaron con concentraciones crecientes de los sustratos anteriormente indicados disueltos en tampón fosfato 100 mM de pH 6. La actividad AAO fue determinada midiendo la tasa de oxidación de los diferentes alcoholes a sus correspondientes aldehídos según el método descrito en el apartado 4.4.2.

Los coeficientes de extinción molar para los siguientes aldehídos fueron calculados bajo las mismas condiciones del ensayo de valoración de las actividades: *p*-fluorobenzaldehído ($\epsilon_{252} = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), *m*-fluorobenzaldehído ($\epsilon_{246} = 10280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), *p*-clorobenzaldehído ($\epsilon_{260} = 15862 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), *m*-clorobenzaldehído ($\epsilon_{240} = 5923 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), cinamalaldehído ($\epsilon_{310} = 15600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 2,4-hexadien-1-al ($\epsilon_{280} = 30140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y *p*-carboxibenzaldehído ($\epsilon_{290} = 2552 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El resto fueron tomados de la literatura: benzaldehído ($\epsilon_{250} = 13800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), veratraldehído ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), *m*-anisaldehído ($\epsilon_{314} = 2540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), *p*-anisaldehído ($\epsilon_{285} = 16950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Guillén *et al.*, 1992) y 3-cloro-*p*-anisaldehído ($\epsilon_{295} = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (de Jong *et al.*, 1994).

A partir de los datos obtenidos se determinaron la constante de afinidad aparente (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) por el método de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk ($1/V$ frente a $1/S$), donde S es la

concentración del sustrato ensayada y V es la velocidad de reacción enzimática obtenida a esa concentración. La constante catalítica (k_{cat}) fue calculada con la masa molecular obtenido por espectrometría de masas, que fue de 69742 y 61847 daltons para la AAO* de *E. nidulans* y *E. coli* respectivamente. Las medias y errores estándar de k_{cat}/K_m se obtuvieron mediante el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten normalizada definida como $v = (k_{cat}/K_m)[S]/(1 + [S]/K_m)$.

8.5.2. Estudios de inhibición

Los ensayos de inhibición se realizaron con chavicol (*p*-hidroxialilbenceno) de Quest, y ácido *p*-anísico, *p*-metoxibencilamina, bencil-metil-eter y tolueno de Aldrich, utilizando como sustrato alcohol veratrílico. Con los datos obtenidos se realizaron gráficas de dobles recíprocos para determinar el tipo de inhibición y poder calcular la constante de equilibrio para la fijación del inhibidor (K_i).

8.5.3. Cinéticas rápidas con flujo detenido (*stopped-flow*)

Se utilizó un aparato de mezcla rápida con flujo detenido modelo SX.17 MV de Applied Photophysics conectado a un ordenador Acorn 5000. Los ensayos se realizaron en anaerobiosis (Medina *et al.*, 1998). Estos estudios se llevaron a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza.

8.5.3.1. Preparación de las muestras en anaerobiosis

Las muestras de enzima y sustrato se prepararon por separado en tonómetros de vidrio con un sistema de doble apertura. Al tonómetro con la enzima se le adicionaron 10 U de una solución comercial de glucosa oxidasa, y al que contenía el sustrato se añadió glucosa a una concentración final de 310 mM (todo ello para garantizar las condiciones de anaerobiosis durante las medidas). Por su extremo superior los tonómetros se conectan al tren anaeróbico, aplicándose sucesivos ciclos de argón y vacío. El tren anaeróbico es un sistema de tubos con llaves de paso conectados a una bomba de vacío y una botella de argón que fluye a través de una columna de catalizador para eliminar las posibles trazas de oxígeno. Tras la anaerobiosis

los tonómetros se conectaron a la entrada de las jeringas del equipo de *stopped-flow*.

8.5.3.2. Medidas en el equipo de *stopped-flow*

Para conseguir condiciones anaerobias en el aparato de *stopped-flow*, se hizo pasar varias veces a través del sistema una disolución de ditionito sódico saturada en anaerobiosis. Los restos de ditionito fueron eliminados con posteriores disparos de tampón fosfato 100 mM pH 6 también aneróbico.

Para el cálculo de las tasas de reoxidación de la AAO* por el oxígeno molecular se utilizó tampón fosfato 200 mM de pH 6, saturado con oxígeno. Para la fotorreducción previa de la enzima se añadieron al tonómetro 4 mL de la AAO*, 50 μ L de EDTA 80 μ M y 5-deazariboflavina 5 μ M. Tras conseguir condiciones anaeróbicas en el interior del tonómetro, la mezcla se iluminó con una lámpara halógena de 50 W mientras se continuaban realizando ciclos continuos de argón y vacío. Una vez reducida la muestra se cerró la llave superior del tonómetro y, con presión positiva de argón, se desconectó del tren de anaerobiosis. Todas las muestras fueron inyectadas en el equipo de *stopped-flow* bajo presión positiva de argón.

Para las cinéticas de reducción de la AAO* oxidada (espontáneamente) se utilizaron los alcoholes veratrílico, *p*-anisílico y 3-cloro-*p*-anisílico a distintas concentraciones. También se observó la reducción de la enzima con el *p*-anisaldehído. Las medidas se realizaron a 25°C y la reducción de la enzima se siguió a través de descenso de absorbancia a 460 nm.

8.5.3.3. Ajuste y obtención de parámetros cinéticos

Los datos obtenidos se analizaron mediante el *software* del equipo Applied Photophysics SX.17 MV. Los ajustes realizados permitieron obtener las constantes observadas (k_{obs}) cuyas unidades vienen dadas en s^{-1} .

8.6. Estudios por ^{19}F NMR

8.6.1. Sustratos empleados

Los sustratos empleados fueron los alcoholes *o*-fluorobencílico, *m*-fluorobencílico y *p*-fluorobencílico y el *p*-fluorobenzaldehído (todos ellos de Fluorochem) a una concentración 1 mM en tampón fosfato 100 mM, pH 6.

8.6.2. Condiciones de reacción

La mezcla de reacción contenía 0.5 mM de sustrato y 20 μ L de una solución de AAO para dar una concentración de 22.5 μ g/mL (o hasta 5 veces más alta en los ensayos de oxidación de aldehídos aromáticos) en 2 mL de tampón fosfato 100 mM, pH 6. Para evitar la autooxidación de los sustratos y productos de la reacción enzimática, se adicionó ascorbato sódico (ajustado a pH 6) a una concentración final 1 mM.

Tras 1 y 3 h a 25°C en agitación, la reacciones enzimáticas fueron detenidas mediante congelación en nitrógeno líquido y conservadas a -20°C. Para los análisis de ^{19}F NMR se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 5 min, analizándose el sobrenadante.

8.6.3. Análisis espectroscópico

Las medidas se realizaron a 7°C en un espectrómetro Bruker DPX 400 equipado con una sonda selectiva de ^{19}F , tal como describen Mooen et al. (2001). El rango espectral de las medidas fue de 50 KHz. El volumen de muestra fue de 1.6 mL de reacción enzimática conteniendo ácido *p*-fluorobenzoico como patrón interno. La concentración de los compuestos liberados en la reacción enzimática fue calculada mediante integración y por comparación con el patrón interno usando el programa XWIN-NMR ver. 2.6 (Bruker). Las medidas se realizaron en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wageningen.

9. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un dicrógrafo JASCO J700, utilizando una cubeta de 10 mm de paso óptico. La concentración de proteína fue de 0.7 mg/mL en tampón fosfato 10 mM de pH 6. Al espectro de la proteína se le restó el blanco correspondiente al tampón.

10. Obtención de variantes de la AAO por mutagenesis dirigida

10.1. Diseño y síntesis de los oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la mutagénesis dirigida (mediante PCR) se realizó de manera individualizada en función de la mutación a incorporar. En general, se realizaron las siguientes consideraciones para el diseño: los oligonucleótidos debían tener un tamaño entre 25 y 45 pares de bases; su temperatura de fusión debía ser mayor o igual a 78°C; la mutación a incorporar debía situarse en medio de la secuencia correcta del oligonucleótido; su contenido en citosina y guanina debía ser del 40% y los extremos del oligonucleótido debían acabar en una de estas dos bases.

A continuación se detallan las oligonucleótidos utilizados y sus secuencias. No se muestra la hebra complementaria (dirección 3→5) pero también fue diseñada y sintetizada incorporando la mutación.

H502

5' -GCCAACACGATTTTCC**ACCC**AGTTGGAACGGCC-3' secuencia original
5' -GCCAACACGATTTTCTCC**CC**AGTTGGAACGGCC-3' oligo H502L directo
5' -GCCAACACGATTTT**CAG**CCAGTTGGAACGGCC-3' oligo H502S directo
5' -GCCAACACGATTTTCCG**CC**AGTTGGAACGGCC-3' oligo H502R directo

H546

5' -CCCTTCGCGCCCAACGCAC**AT**ACCCAAGGACCG-3' secuencia original
5' -CCCTTCGCGCCCAACGCAC**T**TACCCAAGGACCG-3' oligo H546L directo
5' -CCCTTCGCGCCCAACG**CAAG**TACCCAAGGACCG-3' oligo H546S directo
5' -CCCTTCGCGCCCAACGCAC**GC**ACCCAAGGACCG-3' oligo H546R directo

H91

5' -GGTCTAGCTCTG **T**TCACTACATGGTCATGATGCG-3' secuencia original
5' -GGTCTAGCTCTG **T**TA**G**TTACATGGTCATGATGCG-3' oligo H91S directo

Y78

5' -GGTCGGTCAATTGCG**TAT**CCTCGCGGCCGTATG-3' secuencia original
5' -GGTCGGTCAATTGCG**GCT**CCTCGCGGCCGTATG-3' oligo Y78A directo
5' -GGTCGGTCAATTGCG**GA**ACCTCGCGGCCGTATG-3' oligo Y78F directo

Y92

5' -GGTCTAGCTCTGTTCACT**AC**ATGGTCATGATGCG-3' secuencia original
 5' -GGTCTAGCTCTGTTCA**CGCC**ATGGTCATGATGCG-3' oligo Y92A directo
 5' -GGTCTAGCTCTGTTCA**TT**CATGGTCATGATGCG-3' oligo Y92F directo

F501

5' -CGCCAACACGATT**TTCC**ACCCAGTTGGAACGG-3' secuencia original
 5' -CGCCAACACGATT**GCCC**ACCCAGTTGGAACGG-3' oligo F501A directo
 5' -GCCAACACGATT**TTAC**GACCAGTTGGAACGGC-3' oligo F501Y directo

L315

5' -CCGACCATT**TTGCTC**CTTCCTGCTGCC-3' secuencia original
 5' -CCGACCATT**TTGGCC**CTTCCTGCTGCC-3' oligo L315A directo

I401

5' -CCACCCAGCT**ATCC**CTCGCCCTGAC-3' secuencia original
 5' -CCACCCAGCT**GCCC**CTCGCCCTGAC-3' oligo I401A directo

R403

5' -CCACCCAGCTATCC**CTCG**CCCTGACACTGGCAGC-3' secuencia original
 5' -CCACCCAGCTATCC**CTAG**CCCTGACACTGGCAGC-3' oligo R403S directo

T413

5' -CTTTATGAGTGTT**ACAA**ACGCGTTGATTCTCC-3' secuencia original
 5' -CTTTATGAGTGTT**GCAA**ACGCGTTGATTCTCC-3' oligo T413A directo

10.2. Reacción de PCR e incorporación de la mutación

Tabla 18. Mezcla de la reacción de PCR

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>
Tampón	5 μ L
DNA molde (pALAAO 10 ng)	1 μ L
Cebador 1 (25 ng)	5 μ L
Cebador 2 (25 ng)	5 μ L
Mezcla de dNTP	1 μ L
<i>Q</i> kick solución	3 μ L

El siguiente paso fue la incorporación de la mutación en la secuencia de la AAO presente en el plásmido pALAAO (apartado 6.1.1) por PCR

utilizando los cebadores descritos anteriormente. Como DNA polimerasa de alta fidelidad se utilizó la Turbo polimerasa *Pfu* de Stratagene®. En las Tablas 18 y 19 se describen las condiciones de la reacción de PCR y los ciclos utilizados.

Tabla 19. Ciclos de la reacción de PCR

<i>Partes</i>	<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	1	95°C	60 s
2	18	95°C	50 s
		60°C	50 s
		68°C	480 s
3	1	68°C	420 s

10.3. Digestión del DNA plasmídico parental

La digestión del DNA plasmídico parental no mutado se realizó con endonucleasa *DpnI* de Stratagene. Esta enzima es específica para DNA metilado y hemimetilado. Esto nos permitió quedarnos sólo con el DNA plasmídico que se amplificó en la reacción y que es el que lleva incorporada la mutación diseñada.

11. Análisis informáticos

11.1. Acoplamiento molecular (*docking*)

Con objeto de predecir la participación de los residuos de la AAO en la unión de sustratos se realizaron estudios de acoplamiento molecular (*docking*). Para ello se utilizó el modelo molecular de la AAO (entrada PDB: 1QJN) y las coordenadas atómicas de alcoholes de diferentes estructuras y tamaños moleculares (tales como 2,4-hexadien-1-ol, y alcoholes bencílico, veratrílico, *p*-anisílico y cinamílico). Los cálculos se realizaron utilizando el programa AutoDock ver.3 (Morris *et al.*, 1998), que realiza acoplamientos moleculares basados en interacciones estéricas y de carga. Los ficheros de coordenadas de los sustratos se generaron con ChemDraw Ultra y Chem3D Ultra (CambridgeSoft Corp.).

11.2. Análisis de los modelos moleculares

Para el análisis de los resultados del *docking*, la comparación de estructuras moleculares de diferentes flavoenzimas, el diseño de las distintas variantes, y la obtención de diferentes tipos de representaciones moleculares se utilizaron los programas Swiss-PdbView ver. 3.7b y WebLab ViewerPro ver. 3.0 entre otros.

Resultados

1. Expresión heteróloga de la AAO de *P. eryngii*

El cDNA de la AAO de *P. eryngii* se expresó en *E. nidulans*, un hongo modelo de tipo ascomiceto (mas conocido con el nombre de su forma conidial *A. nidulans*) y en *E. coli*.

1.1. Expresión heteróloga en *E. nidulans*

La expresión en *E. nidulans* permitió obtener enzima recombinante (AAO*) en forma activa para diferentes estudios.

1.1.1. Sistema de expresión heteróloga en *E. nidulans*

Se utilizó el vector de expresión pALCA1 en el que se clonó un fragmento de 1779 pb correspondiente al cDNA de la AAO de *P. eryngii*, incluyendo la secuencia señal, obteniéndose el plásmido pALAAO (Fig.8A). Para la construcción del transcrito de fusión, *alca(p)::aao(cdna)*, el cDNA de la AAO (fragmento *Sma*I-*Eco*RI) se fusionó con el promotor del gen *alcA* y el terminador transcripcional del gen *trpC*, ambos de *E. nidulans*. Con el plásmido pALAAO se transformaron protoplastos de la cepa *E. nidulans* *biA1*, *metG1*, *argB2* (incluyendo auxotofía para arginina), aislándose los clones que crecieron en ausencia de arginina.

1.1.2. Producción y purificación de la AAO* de *E. nidulans*

La AAO* expresada en *E. nidulans* se obtuvo tras crecimiento del micelio en medio líquido mínimo e inducción con treonina. Los niveles más altos, unas 200 U/L (aproximadamente 1 U/mg de proteína), se obtuvieron entre las 56 y las 74 h de crecimiento.

Para la purificación de la AAO* expresada en *E. nidulans* se utilizaron cultivos de 48 h en medio con treonina. Una vez retirado el micelio por filtración, los líquidos de cultivo, fueron concentrados por ultrafiltración tangencial obteniéndose un crudo enzimático. En el primer paso cromatográfico se utilizó un gel de exclusión molecular de baja eficacia, Sephacryl® S-200, y tampón tartrato 10 mM, pH 3. La elección de este tampón se basó: i) en la estabilidad de la AAO* a pH ácido; y ii) en la adsorción selectiva de proteínas por este gel en función del pH (Guillén *et al.*, 1992). En la Fig. 9A se muestra un perfil cromatográfico típico.

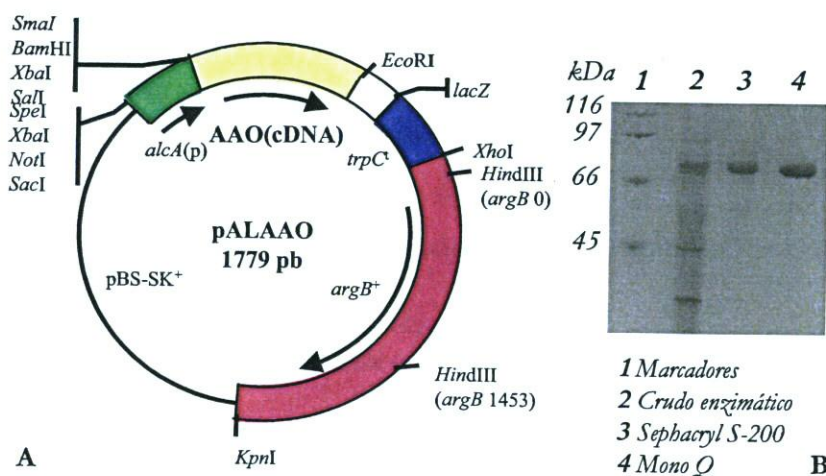


Figura 8. Producción de AAO* en *E. nidulans*. A. Mapa del plásmido pALAAO. Este vector de expresión contiene el cDNA de la AAO junto con el promotor *alcA*, el terminador transcripcional *trpC* y el gen *argB*, este último como marcador de selección. B. Electroforesis en gel de poliacrilamida (condiciones desnaturalizantes) durante el proceso de purificación de la AAO* expresada en *E. nidulans*.

La curva de absorbancia a 280 nm, indicativa de los niveles de proteína, presentó un pico entre 100 y 150 ml de volumen de elución, coincidente con el único pico de actividad AAO*. Las fracciones con actividad AAO se concentraron, dializaron frente a tampón fosfato 10 mM, pH 5,5, y cromatografiaron en una columna MonoQ[®] utilizando el tampón anterior y un gradiente de NaCl. Un perfil cromatográfico típico se muestra en la Fig. 9B. En él se observa un pico mayoritario de proteína, que presenta absorbancia a 465 nm y se corresponde con la actividad AAO. La relación A_{280nm}/A_{465nm} de la AAO* tras cromatografía MonoQ[®] fue de 10. Tras este paso, la AAO* quedó purificada a homogeneidad, tal como se muestra en la electroforesis en gel de poliacrilamida realizada en condiciones desnaturalizantes (Fig. 8B).

La actividad, rendimiento, proteína total, actividad específica y grado de purificación durante el proceso de purificación de la AAO* expresada en *E. nidulans* se muestran en la Tabla 20.

Para el cálculo de su masa molecular y determinación de la secuencia N-terminal, las fracciones con actividad AAO* purificadas tras el paso por

MonoQ®, se concentraron y pasaron por una columna de Sephadex® 75 equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 6, con NaCl 150 mM. En el perfil cromatográfico (resultado no mostrado) se observó un único pico de proteína con absorbancia a 465 nm y actividad AAO. La relación A_{280}/A_{465} de la AAO* tras este paso cromatográfico siguió siendo de 10.

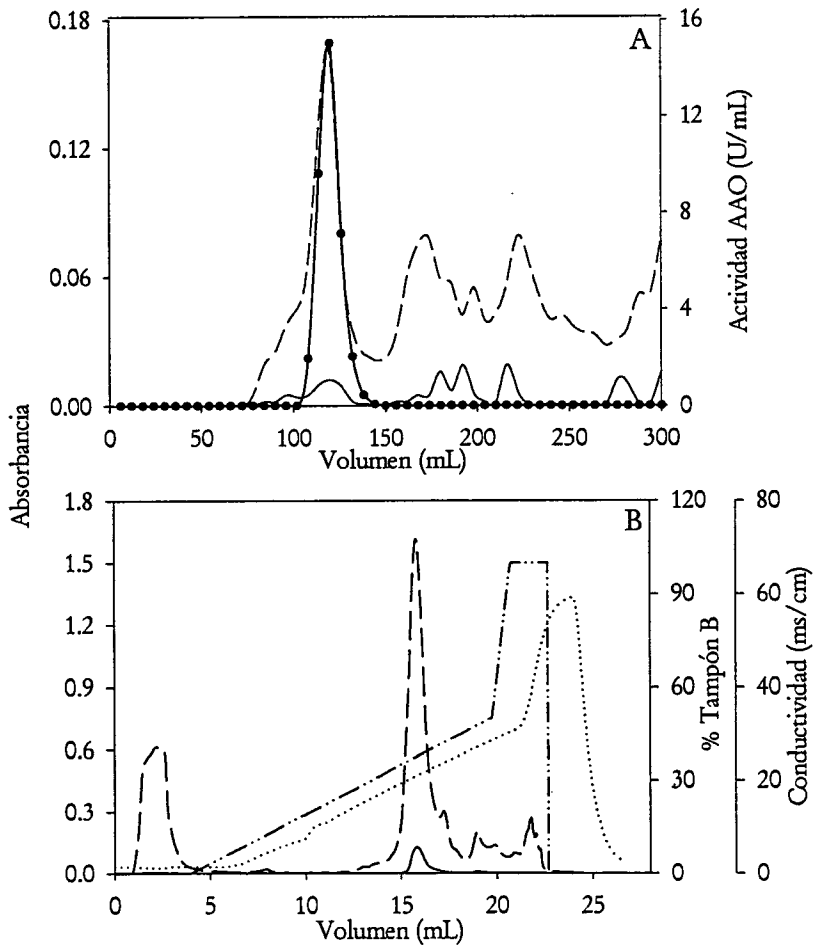


Figura 9. Purificación de la AAO* de *E. nidulans*. A. Perfiles cromatográficos en Sephacryl® S-200 del concentrado enzimático. B. Perfiles cromatográficos en MonoQ® de las fracciones con actividad AAO procedentes de Sephacryl® S-200. Actividad AAO (●), absorbancia a 465 nm (—) y 280 nm (---), conductividad (....) y gradiente teórico (-.-).

Tabla 20. Proceso de purificación de la AAO* a partir de un cultivo de 48 h de *E. nidulans* (500 mL)

Etapas de purificación	Actividad AAO (U)	Rendimiento (%)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Grado de purificación (x)
Cultivo de 48 h	85.9	100.0	17.1	5.0	1.0
Concentrado	55.4	65.0	6.6	9.9	2.0
Sephacryl S-200	60.0	70.2	2.1	28.3	5.6
MonoQ®	32.5	63.2	0.3	102.1	20.3

1.1.3. Procesamiento N-terminal de la AAO* de *E. nidulans*

Para la secuenciación del extremo N-terminal de la AAO* expresada en *E. nidulans* se utilizó una muestra purificada en Sephadex® 75, que fue sometida a degradación de Edman automatizada. En los cromatogramas se observó : i) una secuencia mayoritaria con tres aminoácidos más que la secuencia N-terminal de la AAO salvaje madura de *P. eryngii*; y ii) una secuencia minoritaria coincidente con la secuencia N-terminal de la AAO salvaje. Los tres aminoácidos adicionales (leucina, prolina y treonina) pertenecen a la secuencia del péptido señal (formado por 27 aminoácidos) (Fig. 10) (Varela *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren diferencias en la modificación post-traducciona del extremo N-terminal de la proteína. Estas diferencias indican que *E. nidulans* no reconoce de forma correcta el péptido señal de *P. eryngii*, originándose así distintas formas de AAO* madura.



Figura 10. Péptido señal e inicio de la AAO madura secretada por *P. eryngii*. La metionina de inicio aparece recuadrada y la secuencia N-terminal de la AAO madura está subrayada (la flecha indica el punto de corte que da lugar a la secuencia N-terminal mayoritaria en *E. nidulans*).

Para separar las distintas formas de AAO* producidas por *E. nidulans* se realizó una nueva cromatografía de intercambio aniónico con columna MonoQ® aplicando un suave gradiente de elución (60-100 mM de NaCl en

90 min). Como se muestra en la Fig. 11, en estas condiciones eluyeron 3 picos con absorbancia tanto a 280 nm como a 465 nm y actividad AAO. Los tres picos se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, observándose una única banda de proteína con la misma movilidad electroforética en los tres casos (dato no mostrado). La secuenciación del extremo N-terminal de las tres formas de AAO* mostró las secuencias presentadas en la Fig. 12, donde se puede observar como: i) el pico 2 poseía la secuencia original descrita para el extremo N-terminal de la AAO madura de *P. eryngii*; ii) el pico 3 correspondía a la secuencia de la AAO madura con tres aminoácidos adicionales procedentes del péptido señal (iniciándose con un residuo de Leucina en el extremo N-terminal); y iii) el pico 1 correspondía a la AAO madura con cinco residuos adicionales (iniciándose con un residuo de treonina).

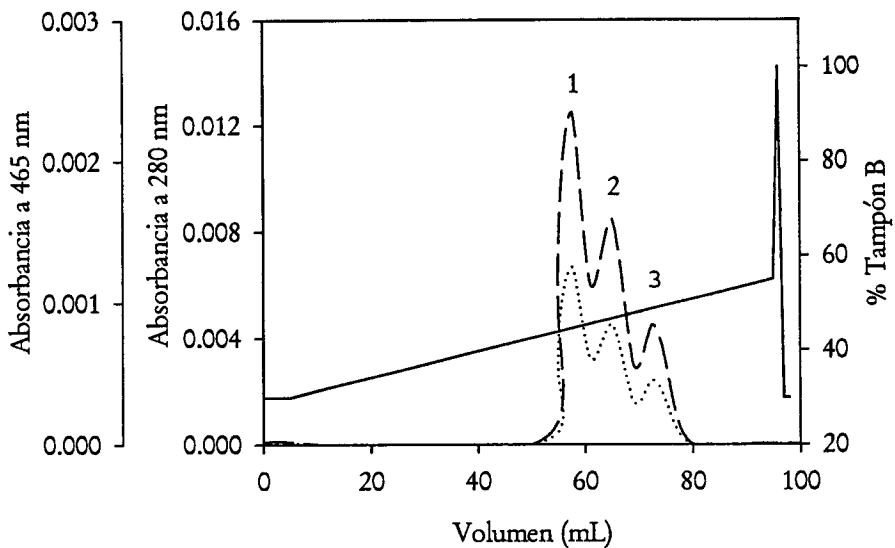


Figura 11. Separación cromatográfica (MonoQ®) de tres formas distintas de AAO* tras expresión heteróloga en *E. nidulans*. Gradiente teórico (—), absorbancia a 280 nm (--) y a 465 nm (.....).

Pico 1: T N L P T A D F D Y Y V V V G A G N A G N A
Pico 2: A D F D Y Y V V V G A G N A G N A
Pico 3: L P T A D F D Y Y V V V G A G N A G N A

Figura 12. Secuencias N-terminales de las tres formas de AAO* (picos 1-3 de la Fig. 11) encontradas tras expresión en *E. nidulans*. Las flechas indican los 3 puntos de corte sobre la secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA de la AAO de *P. eryngii*.

Las tres formas de AAO* purificadas presentaron propiedades catalíticas semejantes frente al alcohol *p*-anisílico, utilizado como sustrato de referencia (Tabla 21). Por lo tanto los estudios posteriores se trabajó con un gradiente 0-250 mM de NaCl en el paso final de purificación (MonoQ), sin intentar separar las tres formas de AAO* que, aunque diferían en el procesamiento post-traducciona de su extremo N-terminal, poseían propiedades catalíticas semejantes.

Tabla 21. Constantes cinéticas frente al alcohol *p*-anisílico de las tres formas de AAO* purificadas de *E. nidulans*

Formas purificadas	K_m (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (U mg ⁻¹ mM ⁻¹)
Pico 1	0.03	109	3.5
Pico 2	0.03	147	4.2
Pico 3	0.03	142	4.0

1.2. Expresión heteróloga de la AAO en *E. coli*

Este sistema de expresión se utilizó para obtener cantidades mayores de AAO* con objeto de realizar estudios de cinética rápida, entre otros. Ya que los niveles de expresión en *E. nidulans* suponían un factor limitante para abordar estos estudios.

1.2.1. Sistema de expresión en *E. coli*

El cDNA que codifica la AAO de *P. eryngii*, sin incluir los 27 aminoácidos del péptido señal, se clonó en el vector de expresión pFLAG1 de *E. coli*, obteniéndose el plásmido pFLAG1-AAO (Fig. 13A). El cDNA se insertó

entre los sitios *NdeI* y *BglII*, quedando bajo el control del promotor *tac* inducible por IPTG (análogo no hidrolizable de la galactosa). Como marcador de selección se utilizó el gen *amp^r*.

1.2.2. Producción y purificación de la AAO* de *E. coli*

El vector pFLAG1-AAO se empleó para transformar *E. coli* W3110 seleccionándose las colonias resistentes a ampicilina, que contenían el plásmido pFLAG1-AAO (Fig. 13A). La proteína fue producida en forma insoluble formando cuerpos de inclusión. La estrategia para la obtención de AAO* soluble en forma activa pasó por el aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión, su solubilización y el plegado de la proteína desnaturalizada. Para el plegado *in vitro* y la obtención de la holoenzima fue necesario adicionar FAD. Se consiguió una correcta incorporación de éste al centro activo de la AAO*, tal como mostró el espectro de absorción (ver Fig. 21.B).

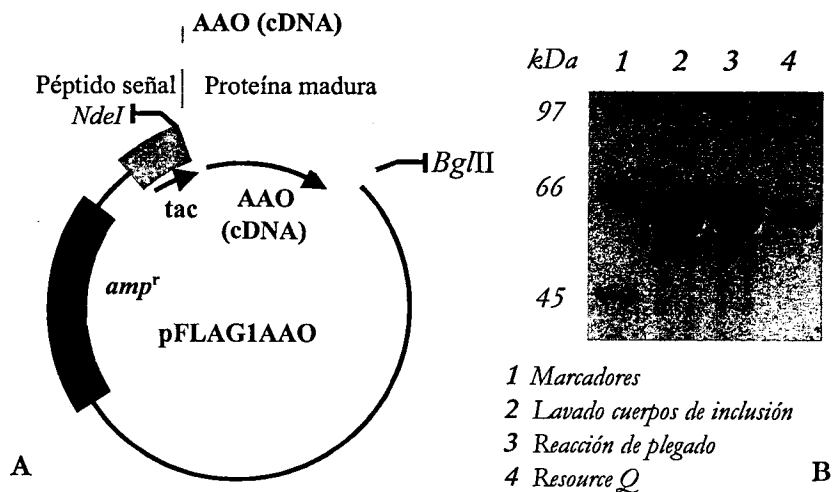


Figura 13. Producción de AAO* en *E. coli*. A. Mapa del plásmido pFLAG1-AAO que contiene el cDNA de la AAO sin su péptido señal, el promotor *tac* y el marcador de resistencia a ampicilina (*amp^r*). B. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes durante la purificación de la AAO* de *E. coli*.

Para la purificación de la AAO* de *E. coli* se partió de una mezcla de plegado, con actividad máxima tras 5 días en oscuridad a 4°C. La actividad,

rendimiento, proteína, actividad específica y grado de purificación durante el proceso de purificación se incluye en la Tabla 22.

Tabla 22. Proceso de purificación de la AAO* de *E. coli*. (1 litro de cultivo).

Etapas de purificación	Actividad AAO (U)	Rendimiento %	Proteínas mg	Actividad específica (U/mg)	Grado de purificación
Mezcla de plegado	3450	100	670	5	1
Concentrado	2743	80	197	14	2.8
Resource® Q	2407	70	25	96	19.2

En una primera etapa la solución de plegado fue concentrada por filtración tangencial y diálisis frente a sacarosa. A continuación se dializó frente a tampón fosfato 10 mM, pH 5.5. Por último la muestra concentrada fue cromatografiada en una columna de intercambio iónico Resource® Q. Un perfil cromatográfico típico se muestra en la Fig. 14, caracterizado por un pico mayoritario de proteína con actividad AAO y una relación A₂₈₀/A₄₆₅ de 12. La proteína se encontraba purificada a homogeneidad tal como pudo verse tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Fig. 13B).

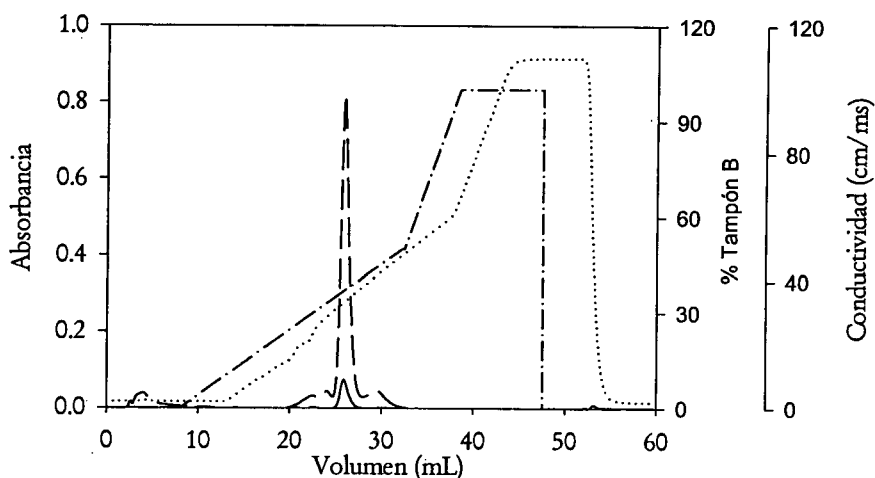


Figura 14. Perfil cromatográfico en Resource™ Q durante la purificación de la AAO* de *E. coli*. Absorbancia a 465 nm (—), a 280 nm (---), conductividad (....) gradiente teórico (-.-.-.-).

2. Caracterización físico-química de la AAO*

2.1. pH óptimo y estabilidad al pH

Los ensayos se llevaron a cabo en tampón fosfato-citrato-borato 100 mM. Como se observa en la Fig. 15A, la AAO* de *E. nidulans* presentó los niveles más altos de actividad entre pH 5 y 6. La AAO* de *E. coli* presentó el

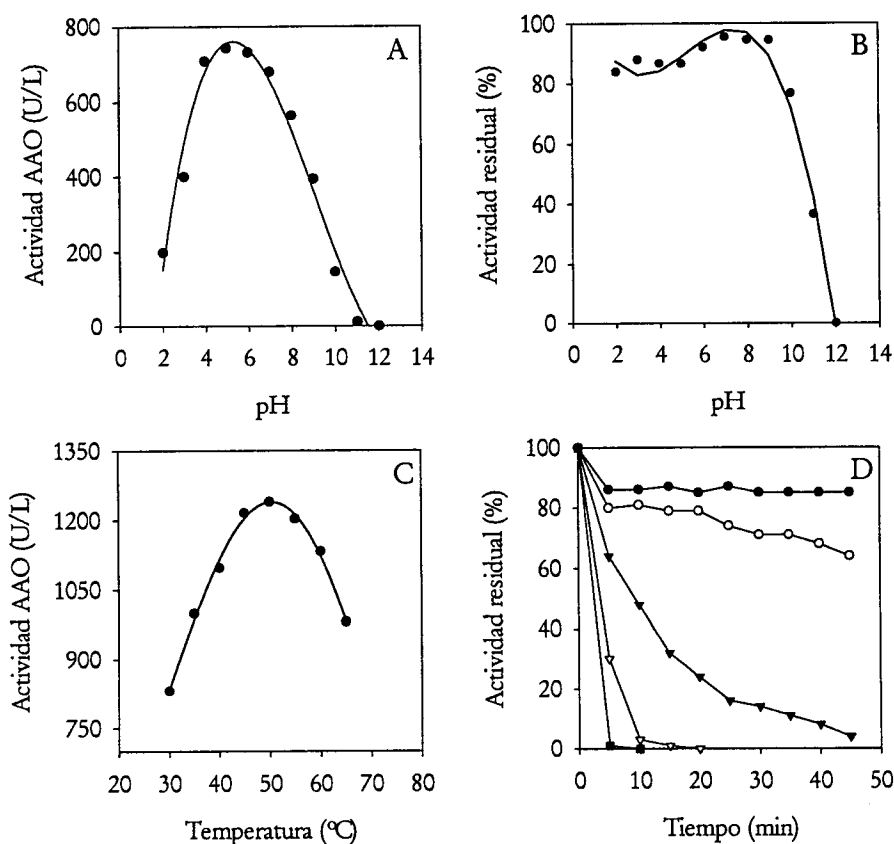


Figura 15. Influencia del pH y la temperatura en la actividad de la AAO* de *E. nidulans*. A. pH óptimo. B. Estabilidad al pH tras 24 horas a 25°C. C. Óptimo de actividad en función de la temperatura. D. Estabilidad a 55°C (●), 60°C (○), 65°C (▲), 70°C (▽) y 75°C (■) (los ensayos de A y B se realizaron a temperatura ambiente y los de C y D a pH 5).

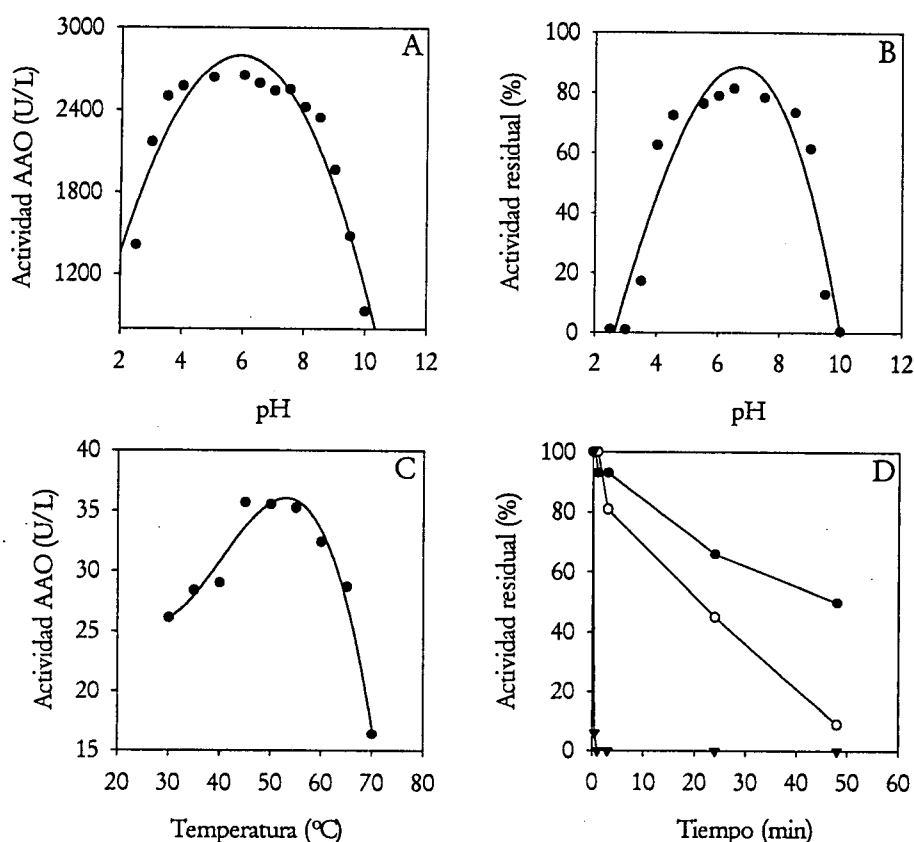


Figura 16. Influencia del pH y la temperatura en la actividad de la AAO* de *E. coli*. A. pH óptimo. B. Estabilidad al pH tras 24 h a 25°C. C. Óptimo de actividad en función de la temperatura. D. Estabilidad a 25°C (●), 37°C (○) y 65°C (▼) (los ensayos de A y B se realizaron a temperatura ambiente y los de C y D a pH 5).

óptimo de actividad en un amplio rango de pH entre 4 y 8 (Fig. 16A). En cuanto a la estabilidad al pH, la AAO* de *E. nidulans* permaneció estable durante 24 h a 25°C en el rango de pH 3-9 (con actividad residual por encima del 80%) (Fig. 15B), experimentando una brusca disminución de la actividad por encima de estos valores hasta ser inactiva a pH 12. La AAO* de *E. coli* fue más inestable en todo el rango de pH probado. Transcurridas 24 h conservó el 70% de su actividad en el rango de pH 4-9, a valores de pH más ácidos resultó prácticamente inactiva.

2.2. Temperatura óptima y estabilidad a la temperatura

En función de los resultados descritos en el apartado anterior, los ensayos de temperatura óptima y estabilidad térmica se realizaron en tampón fosfato 100 mM, pH 5. La temperatura óptima para ambas enzimas fue de 50°C (Figs. 15C y 16C). Las mayores diferencias se observaron nuevamente en la estabilidad, ya que la AAO* de *E. nidulans* permaneció estable a 55°C durante 50 min, mientras que la expresada en *E. coli* transcurridos 50 min a 37°C tan sólo conservó un 9% de su actividad. La AAO* de *E. nidulans* se inactivó tras 10 min a 70°C o temperaturas superiores (Figs. 15D y 16D).

2.3. Masa molecular

La estimación precisa de la masa molecular de la AAO salvaje producida por *P. eryngii* y sus formas recombinantes se llevó a cabo por espectrometría de masas de MALDI-TOF. Los valores obtenidos fueron de 69114 Da para la AAO salvaje, de 69792 Da para la AAO* de *E. nidulans* y de 61847 Da para la AAO* de *E. coli*.

2.4. Grado y tipo de glicosilación

El grado de glicosilación de la AAO salvaje de *P. eryngii* y la AAO* de *E. nidulans* se calculó a partir de las diferencias entre la masa molecular de la AAO* de *E. coli* (no glicosilada) y las de las dos enzimas de origen fúngico. De esta forma se estimó un porcentaje de glicosilación del 10% para la AAO salvaje y del 11% para la AAO* de *E. nidulans*.

En vista de las diferencias en estabilidad de la AAO salvaje y recombinante de *E. nidulans* a pesar de ser sus porcentajes de glicosilación muy similares, se estudió el tipo de glicosilación. Para ello, se trataron con N- y O-glicosidasas comerciales. Las muestras tratadas con O-glicosidasas no mostraron variación de la masa molecular analizada mediante MALDI-TOF. Por el contrario, la AAO* de *E. nidulans* tratada con N-glicosidasas presentó una masa molecular de 65011 daltons, lo que supone un porcentaje de glicosilación del 7%, y la misma movilidad electroforética que la muestra de la enzima salvaje tratada también con desglucosidasas.

3. Estudios de especificidad de sustrato

Estudios de especificidad de sustrato realizados por Guillen et al. (1992) habían mostrado que la AAO de *P. eryngii* es capaz de oxidar alcoholes primarios aromáticos y alifáticos poliinsaturados. El alcohol bencílico es la estructura aromática mas simple oxidada por esta enzima, viéndose afectada la tasa de oxidación de sus derivados por la naturaleza y posición de los sustituyentes introducidos.

3.1. Especificidad de sustrato de la AAO* de *E. nidulans*.

Estudios preliminares con la AAO* de *E. nidulans* realizados por Varela et al. (2001) mostraron que esta enzima recombinante presenta propiedades catalíticas semejantes a las de la AAO salvaje obtenida de *P. eryngii*. Estos estudios fueron completados en este trabajo mediante la búsqueda de nuevos sustratos e inhibidores, incluyendo el uso de ^{19}F NMR y la determinación de constantes cinéticas y de inhibición.

3.1.1. Búsqueda de nuevos sustratos

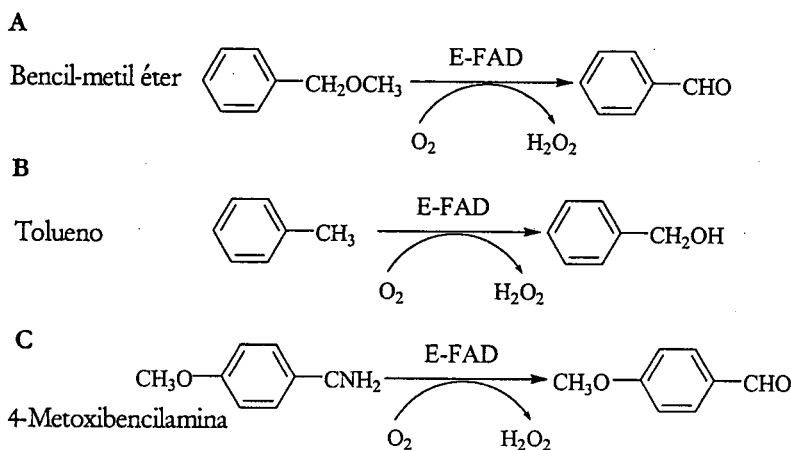


Figura 17. Modelos de reacciones de desmetilación (A), hidroxilación (B) y desaminación (C) catalizadas por flavoenzimas.

Los estudios de especificidad de sustrato tienen como primer objetivo conocer las características estructurales necesarias para que un compuesto pueda unirse al centro activo. Para ello, se probaron diferentes derivados del

alcohol bencílico, encontrándose nuevos sustratos fluorados y clorados incluyendo los alcoholes *m*-fluorobencílico, *p*-fluorobencílico, *m*-clorobencílico, *p*-clorobencílico y 3-cloro-*p*-anisílico (Tabla 23).

Además de la oxidación de alcoholes aromáticos, también se investigaron posibles reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación descritas para otras oxidadas como la vainillil-alcohol oxidasa (Fraaije *et al.*, 1995). Para ello, se ensayaron como posibles sustratos: bencil-metil éter, tolueno y 4-metoxibencilamina (Fig. 17). Tras la incubación de estos compuestos con la AAO* no se observaron cambios en sus espectros, ni producción de agua oxigenada. Sin embargo, estos compuestos resultaron ser inhibidores de la AAO* (ver apartado 3.3).

3.1.2. Estudios mediante ^{19}F NMR

La posible formación de compuestos intermediarios en la reacción de oxidación de alcoholes a aldehídos por la AAO* se estudió por ^{19}F NMR (ver apartado 8.6 de materiales y métodos). Esta técnica ya ha sido utilizada en otros estudios de oxidación con monoxigenasas (Moonen *et al.*, 2001). También se utilizó para poner de manifiesto de forma rápida y concluyente la capacidad de esta enzima para oxidar aldehídos aromáticos a sus respectivos ácidos.

La Fig. 18 muestra el espectro de ^{19}F NMR tras 1 h de incubación de los alcoholes *o*-fluorobencílico, *m*-fluorobencílico y *p*-fluorobencílico con AAO* a una concentración final de 2,25 $\mu\text{g/mL}$. Para estos tres sustratos se observó la formación de un solo producto mayoritario a -124.5 ppm (Fig. 18A), -117.8 ppm (Fig. 18B) y -106,6 ppm (Fig. 18C). Basándose en los desplazamientos químicos de compuestos de referencia, los tres picos se identificaron como *o*-fluorobenzaldehído, *m*-fluorobenzaldehído y *p*-fluorobenzaldehído respectivamente. La señal que apareció en todos los espectros a -122.8 ppm se debió a la formación no enzimática de anión fluor. En la reacción de oxidación del alcohol *m*-fluorobencílico, se pudo observar un pico minoritario con un desplazamiento químico de -117.35 ppm. Este producto de la reacción enzimática no pudo ser identificado, pero podría tratarse de un compuesto intermediario.

El análisis mediante ^{19}F NMR de la reacción de oxidación del *p*-fluorobenzaldehído por la AAO* (Fig. 18D) indicó la formación de un único producto, con un valor de desplazamiento químico de -114.2 ppm correspondiente al ácido *p*-fluorobenzoico. La actividad sobre este aldehído

supuso un 4% respecto a la encontrada con el alcohol *p*-fluorobencílico, y sólo fue observada cuando se aumentó la concentración de sustrato y enzima (hasta 1 mM y 112.5 µg/mL respectivamente).

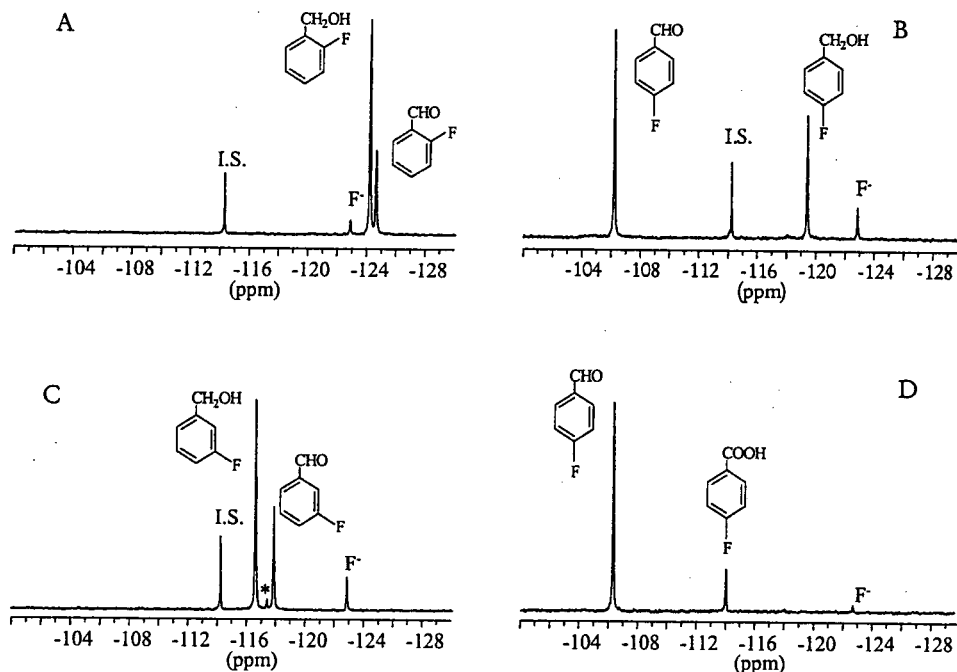


Figura 18. Análisis por ^{19}F NMR de las reacciones de oxidación por la AAO* de los alcoholes *o*-fluorobencílico (A), *m*-fluorobencílico (B) y *p*-fluorobencílico (C) y del *p*-fluorobenzaldehído (D). Los sustratos fueron utilizados a una concentración 0.5 mM para los alcoholes y 1 mM para el aldehído, utilizando tampón fosfato 100 mM, pH 6. IS, patrón interno; *, producto no identificado y F^- , anión fluor.

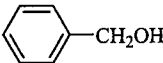
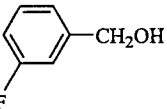
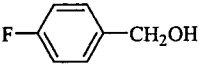
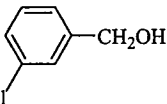
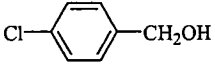
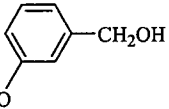
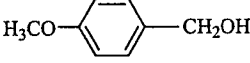
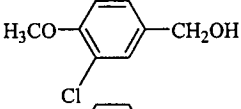
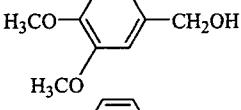
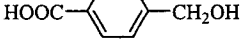
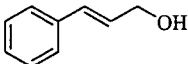
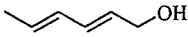
3.1.3. Constantes cinéticas en estado estacionario

En la Tabla 23 se muestran los valores de la constante de afinidad (K_m), constante catalítica (k_{cat}) y eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) para la oxidación en el estado estacionario de distintos sustratos por la AAO* de *E. nidulans*.

Tomando como punto de partida el alcohol bencílico, se investigaron nuevos sustratos y se calcularon las constante de afinidad y catalítica, y la eficiencia de oxidación (así como para otros sustratos ya identificados en estudios de la AAO salvaje, pero para los que no se habían determinado las

Resultados

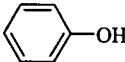
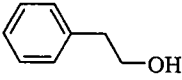
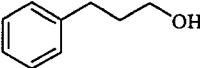
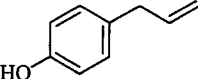
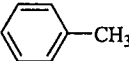
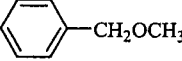
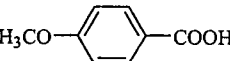
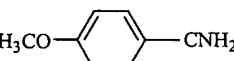
Tabla 23. Constantes cinéticas en estado estacionario de la AAO* de *E. nidulans*. Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 100 mM, pH 6, a temperatura ambiente.

Alcohol	Estructura	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Bencílico		758 ± 110	32 ± 6	47 ± 9
<i>m</i> -Fluorobencílico		504 ± 53	6 ± 0	13 ± 1
<i>p</i> -Fluorobencílico		613 ± 123	35 ± 4	59 ± 6
<i>m</i> -Clorobencílico		109 ± 14	22 ± 1	203 ± 4
<i>p</i> -Clorobencílico		130 ± 0	52 ± 4	398 ± 32
<i>m</i> -Anisílico		293 ± 138	18 ± 6	65 ± 24
<i>p</i> -Anisílico		28 ± 1	149 ± 24	5235 ± 1
3-Cloro- <i>p</i> -anisílico		17 ± 5	62 ± 3	4086 ± 1
Veratrílico		592 ± 24	119 ± 5	210 ± 5
Ácido 4-(hidroximetil) benzoico		20000	0.73	0.04
Cinamílico		748 ± 125	56 ± 10	78 ± 11
2,4-Hexadien-1-ol		92 ± 4	144 ± 36	1271 ± 55

Medias e intervalos de confianza del 95%

constantes cinéticas). El alcohol *p*-anisílico y el 2,4-hexadien-1-ol fueron los mejores sustratos ensayados, con eficiencias de oxidación de 5232 y 1271 s⁻¹ mM⁻¹ respectivamente, frente a las tasas de oxidación mucho más bajas obtenidas con otros alcoholes como el cinámico, bencílico y *m*-fluorobencílico. La alta afinidad y velocidad de oxidación del 2,4-hexadien-1-ol puso de manifiesto que la AAO no tiene ningún impedimento estérico para reconocer y oxidar eficientemente alcoholes alifáticos con dobles enlaces conjugados.

Tabla 24. Constantes de inhibición (K_i). Los ensayos se realizaron utilizando como sustrato alcohol veratrílico (apartado 15.2 de materiales y métodos).

Inhibidor	Estructura	Tipo de inhibición	K_i (mM)
Fenol ¹		competitiva	1.92
2-Fenil-1-etanol ¹		competitiva	2.28
3-Fenil-1-propanol ¹		competitiva	4.48
Chavicol		competitiva	0.110
Tolueno		competitiva	0.92
Bencil-metileter		competitiva	1.35
Ácido <i>p</i> -anisico		competitiva	0.140
4-Metoxibencilamina		acompetitiva	0.250

¹Datos extraídos de Guillén (1991)

Tal como se deduce de los valores de K_m con los distintos derivados del alcohol bencílico ensayados, las sustituciones en posiciones *meta* y *para* sobre el anillo aromático tienen un efecto positivo sobre la afinidad. Por el

contrario, cualquiera de los sustituyentes presentes en posición *meta* provoca un efecto negativo sobre la velocidad de oxidación (K_{cat}) comparada con la del alcohol bencílico.

3.1.4. Estudios de inhibición

En estudios de inhibición realizados con la AAO salvaje de *P. eryngii* se habían encontrado inhibidores competitivos de tipo fenólico. En el presente trabajo se ensayaron diferentes compuestos como inhibidores de la AAO*. La constante de inhibición para el chavicol (4-hidroxiálilbenceno) resultó ser unas 10 veces menor que la del fenol (Tabla 24). Además se ensayaron como posibles inhibidores compuestos aromáticos no fenólicos, como: tolueno, bencil-metil éter, ácido *p*-ánisico y *p*-metoxibencilamina. Todos estos compuestos, a excepción de la *p*-metoxibencilamina, resultaron ser inhibidores competitivos. Los valores más bajos de K_i se obtuvieron con el chavicol y el ácido *p*-ánisico (0.14 y 0.11 mM respectivamente) (Fig. R12). La enzima no fue capaz de oxidar estos compuestos aromáticos, pero presentó una afinidad mayor que para sustratos típicos como el alcohol bencílico.

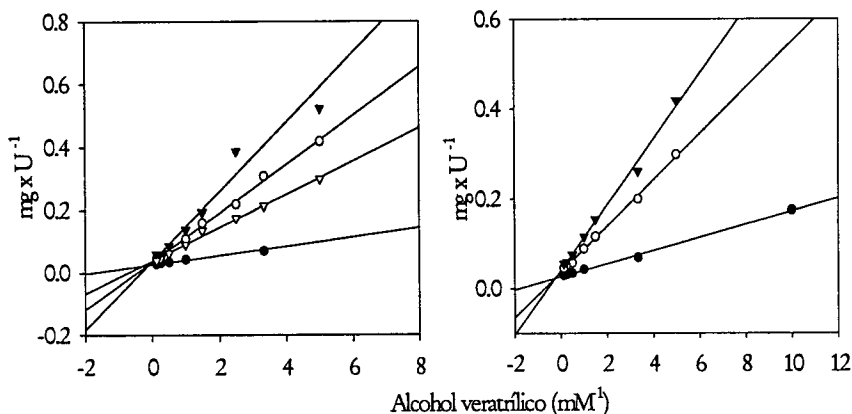


Figura 19. Inhibición competitiva de la AAO*. A Ácido *p*-ánisico: sin inhibidor (), 0.1 mM de ácido *p*-ánisico (O) y 0.2 mM ácido *p*-ánisico (×). B Chavicol: sin inhibidor (), 0.2 mM chavicol (O), 0.3 mM chavicol (Δ) y 0.5 mM chavicol (×). La actividad fue medida con alcohol veratrílico en tampón fosfato 100 mM, pH 6, a temperatura ambiente.

Sin embargo, no resultaron ser ni inhibidores ni sustratos de la AAO alcoholes alifáticos saturados como el metanol (aunque los alcoholes alifáticos poliinsaturados son buenos sustratos). Con ello se evidenció que los compuestos por los que la AAO tiene algún tipo de afinidad deben contener sistemas de dobles enlaces conjugados.

En el caso de la *p*-metoxibencilamina fue necesario realizar el ensayo a pH 8 para observar algún efecto inhibitorio. El tipo de inhibición fue acompetitiva con una K_i de 0.250 mM (Fig. 20).

3.2. Especificidad de sustrato de la AAO* de *E. coli*

Para comprobar las propiedades catalíticas de la AAO* expresada en forma inactiva en *E. coli* y activada *in vitro* se utilizaron los alcoholes bencílico, *m*-anisílico, *p*-anisílico y veratrílico. Se escogieron estos compuestos por estar bien caracterizados como sustratos de la AAO salvaje de *P. eryngii* y la AAO* de *E. nidulans*. Se utilizó también el 2,4-hexadien-1-ol por ser buen sustrato de esta oxidasa, a pesar de no conocerse sus constantes cinéticas para la AAO salvaje de *P. eryngii*.

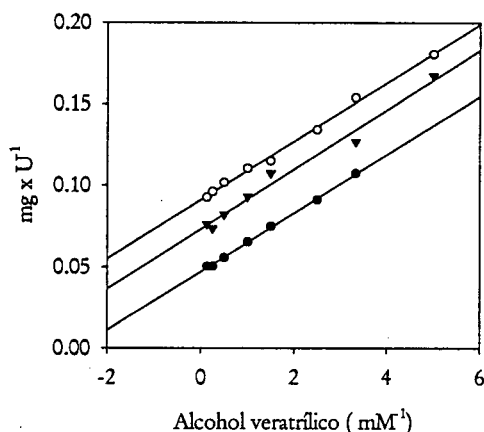


Figura 20. Inhibición acompetitiva de la AAO*. Sin inhibidor (●) y con 0.15 mM (○) y 0.3 mM (▽) de *p*-metoxibencilamina. La actividad fue medida con alcohol veratrílico en tampón fosfato 100 mM, pH 8, a temperatura ambiente.

Tabla 25. Constantes cinéticas de estado estacionario de la AAO salvaje y recombinante (de *E. nidulans* y *E. coli*).

Alcohol		AAO de <i>P. eryngii</i> ¹	AAO* de <i>E. nidulans</i>	AAO* de <i>E. coli</i>
Bencílico	K_m	840	758 ± 110	873 ± 124
	k_{cat}	59	32 ± 6	30 ± 2
	k_{cat}/K_m	70	47 ± 9	35 ± 1
<i>m</i> -Anisílico	K_m	220	293 ± 138	269 ± 29
	k_{cat}	34	18 ± 6	21 ± 0
	k_{cat}/K_m	155	65 ± 24	80 ± 4
<i>p</i> -Anisílico	K_m	40	28 ± 1	37 ± 0.31
	k_{cat}	239	149 ± 24	134 ± 4
	k_{cat}/K_m	5975	5232 ± 1	3865 ± 0
Veratrílico	K_m	410	592 ± 24	541 ± 35
	k_{cat}	143	119 ± 5	99 ± 5
	k_{cat}/K_m	349	210 ± 5	172 ± 4
2,4-Hexadien-1-ol	K_m	n.d	92 ± 4	120 ± 14
	k_{cat}	n.d	144 ± 36	184 ± 0
	k_{cat}/K_m	n.d	1271 ± 55	1543 ± 178

Medias e intervalos de confianza del 95 % de K_m (μM), k_{cat} (s^{-1}) y k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$); n.d: no determinado; ¹tomado de Guillén et al. (1992)

La enzima resultó ser activa sobre todos los sustratos ensayados y mostró propiedades catalíticas muy similares a las de la AAO* de *E. nidulans*. En la Tabla 25 se comparan las constantes cinéticas de la AAO* de *E. nidulans* y *E. coli* y la AAO salvaje obtenida de *P. eryngii*. Las constantes de afinidad para las tres enzimas fueron similares, si bien es cierto que las recombinantes presentaron k_{cat} más bajas que la AAO salvaje.

4. Caracterización espectroscópica

La flavina confiere a las flavoproteínas su característico color amarillo con un espectro de absorción típico en la región UV-visible. La reacción de este cofactor con algunos compuestos como el sulfito sódico, o la unión de sustratos e inhibidores en el centro activo de estas enzimas originan cambios en la flavina y su entorno, que se traducen en modificaciones de su espectro

de absorción. Estos cambios espectrales pueden dar información sobre el mecanismo de reacción de las flavoenzimas.

4.1. Grupo prostético

Las muestras de AAO* de *E. nidulans* y *E. coli* mostraron espectros de absorción similares, tal como puede observarse en la Fig. 21, con dos máximos a 463 y 387 nm. Ambos espectros se corresponden básicamente con el descrito para la AAO salvaje por Guillen et. al. (1992). La relación de absorbancia A_{280}/A_{463} para la AAO en todos los casos fue próxima a 10.

Cuando se sometió la AAO* a tratamiento térmico (70°C durante 5 min), la enzima se desnaturalizó liberándose el grupo prostético, lo cual es indicativo de una unión FAD-AAO no covalente. El espectro de absorción del grupo prostético libre presentó dos máximos de absorción a 450 y 374 nm. A partir del FAD liberado se calculó el coeficiente de absorción molar (a 463 nm) de la AAO*. El valor de ϵ_{463} para la AAO* de *E. nidulans* fue de $10280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y el de la AAO* de *E. coli* fue de $11050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

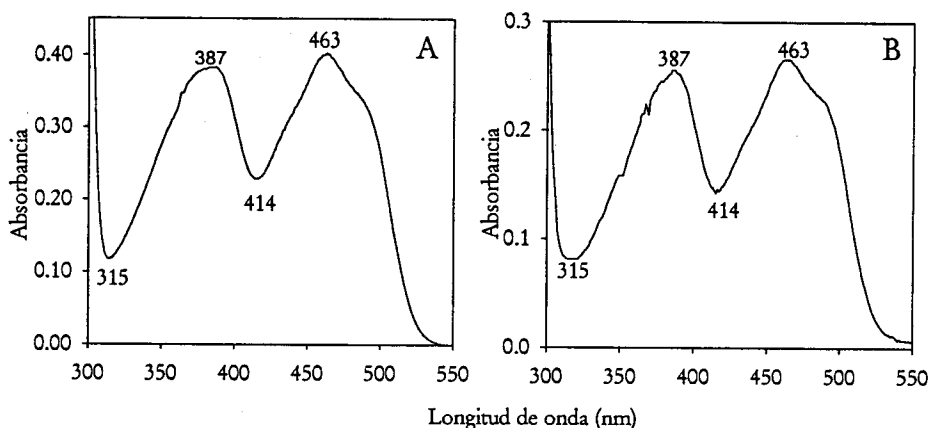


Figura 21. Espectro de absorción de la AAO. A. AAO* de *E. nidulans* (35 μM). B. AAO* de *E. coli* (22 μM). Los espectros fueron realizados en tampón fosfato 10 mM de pH 6.

4.2. Reacciones de reducción del FAD

En la reacción de reducción de algunas flavoproteínas es común que la flavina oxidada no se reduzca directamente a la forma hidroquinona sino

que, tras una reducción de un electrón, forme radicales intermedios de tipo semiquinona. La posible formación de estos radicales en la AAO fue investigada por reducción con ditionito y fotorreducción. Todos los ensayos que a continuación se describen se realizaron con la AAO* obtenida de *E. nidulans*.

4.2.1. Reducción con ditionito y reacción con sulfito

Los espectros obtenidos durante la reducción anaerobia de la AAO* con ditionito sódico se muestran en la Fig. 22, observándose una progresiva disminución del máximo a 463 nm de la enzima oxidada durante su titulación con este agente reductor. La reducción llegó a ser completa, en una rápida reacción monofásica, sin la formación aparente de semiquinona. La enzima reducida se reoxidó completamente tras exponerla al O₂.

Por otro lado la adición de 20 mM de sulfito sódico no provocó cambio alguno en el espectro de absorción de la enzima (dato no mostrado), lo que indica que la AAO* no presenta reactividad frente a este compuesto.

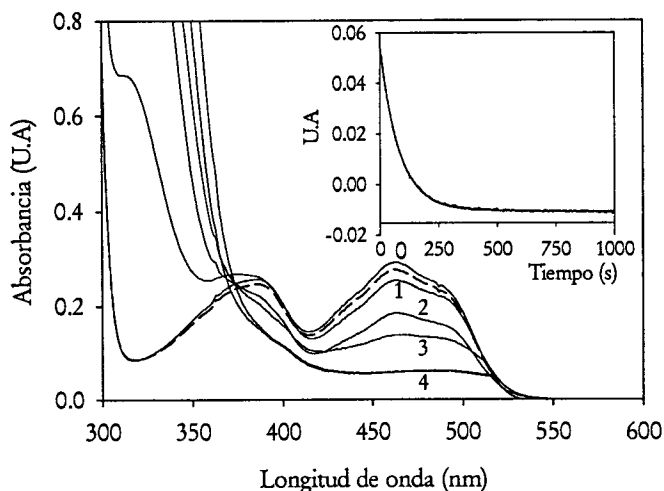


Figura 22. Reducción anaerobia de la AAO* con ditionito. Los espectros fueron realizados en tampón fosfato 100 mM de pH 6. La AAO* (26 μ M) (0) fue titulada con una solución anaerobia de ditionito sódico utilizando concentraciones 0.625 mM (1), 1.25 mM (2), 1.86 mM (3), y 2.5-3.7 mM (4), y luego reoxidada con O₂ (---). El inserto muestra el descenso de absorbancia a 460 nm.

4.2.2. Reducción por el sustrato

La Fig. 23 muestra los cambios en el espectro de absorción de la AAO* durante la oxidación de cantidades crecientes de alcohol *p*-anisílico. Se observó una disminución del máximo de absorción a 463 nm, que es indicativo de la implicación de la flavina en la oxidación de los alcoholes por la AAO. Entorno a 330 nm se observó un punto isobéptico característico de la reducción del FAD por 2 electrones (Chapman y Reid, 1999). Simultáneamente, se dio un aumento progresivo en los valores de absorbancia a 298 nm debido a la formación de *p*-anisaldehído (ver recuadro en la Fig. 23). Finalmente, la AAO* reducida por el sustrato se reoxidó completamente en presencia de O₂, recobrando su espectro y absorbancia original a 463 nm.

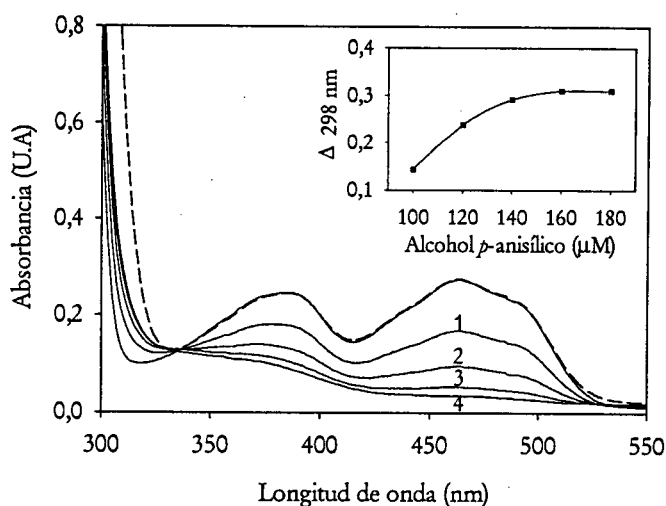


Figura 23. Reducción anaerobia de la AAO* por alcohol *p*-anisílico. Los espectros fueron realizados en tampón fosfato 100 mM, pH 6. La AAO* (24 μM) fue titulada con alcohol *p*-anisílico liberándose 14 μM (1), 20 μM (2), 23 μM (3) y 25 μM (4) de *p*-anisaldehído (calculado a partir de los incrementos de absorbancia a 298 nm para las diferentes concentraciones de alcohol añadidas, mostrado en el recuadro), y posteriormente reoxidada con O₂ (---).

4.2.3. Fotorreducción

Los ensayos de fotorreducción de la AAO* se realizaron a pH 6 y pH 9, en presencia de EDTA y 5-deazaribloflavina. Los espectros obtenidos fueron similares (Fig. 24) y no se observó la formación de radical semiquinona (el radical neutro absorbe a 580-620 nm y la forma aniónica a 400 nm y 380 nm): El espectro de la AAO se vió modificado por la adición de 5-deazaribloflavina.

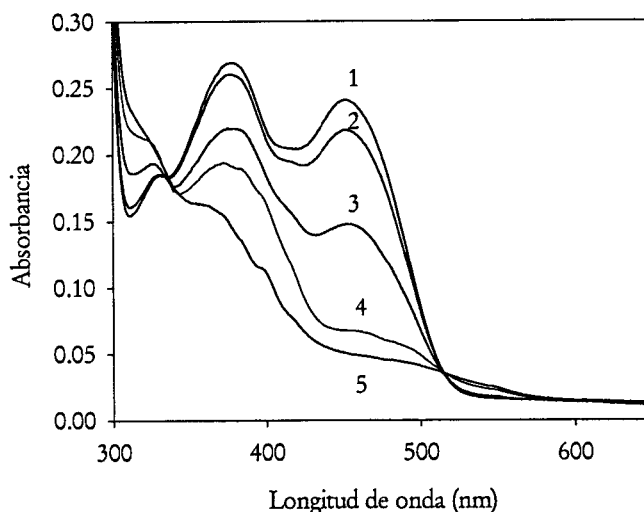


Figura 24. Fotorreducción de la AAO*. La reducción se llevó a cabo en tampón fosfato 100 mM de pH 6 o pH 9, en presencia de EDTA 1 mM y 5-deazaribloflavina 5 μ M. La AAO* (25 μ M) oxidada (1), y después de 5 min (2), 6 min (3), 8 min (4) y 29 min (5) de iluminación.

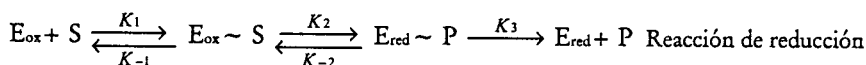
Durante la fotorreducción tan sólo se vieron dos especies diferentes, la forma completamente oxidada y mezclas de la forma oxidada y reducida hasta llegar a la forma completamente reducida de la AAO*. Se observó la existencia de un punto isobéptico sobre los 330 nm, que como ya se mencionó, es indicativo de la reducción de la flavina por transferencia de dos electrones. La AAO* no recobró su espectro original en presencia de O₂, debido quizás a la prolongada exposición a la luz. En la reacción de oxidación tampoco se observaron intermediarios oxidados de la flavina.

5. Estudios de cinética rápida con flujo detenido

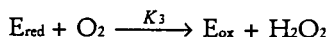
Las reacciones catalizadas por la AAO obedecen a una cinética de tipo "ping-pong" caracterizada por dos semirreacciones en las cuales el FAD es reducido por el sustrato, en la semirreacción de reducción, para ser posteriormente reoxidado por el O₂, en la semirreacción de oxidación (ver reacciones abajo).



Reacción global



Reacción de reducción



Reacción de oxidación

(E enzima; S sustrato; P producto; los subíndices se refieren a las formas oxidada y reducida)

Estas dos reacciones pueden ser estudiadas por separado usando la técnica de mezcla rápida con flujo detenido (*stopped-flow*). Las diferencias en las características espectroscópicas (absorbancia y fluorescencia) del FAD en sus diferentes estados de oxido-reducción, así como en la formación de ciertos intermediarios enzima-sustrato (forma oxidada y reducida) hacen posible la realización de este tipo de estudios cinéticos.

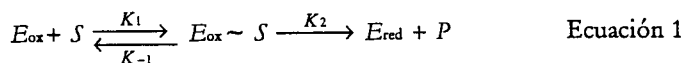
Las cinéticas de reducción de la AAO* para distintos sustratos y su reoxidación por O₂ se han estudiado siguiendo los cambios espectrales a 460 nm durante la oxido-reducción del anillo de flavina (utilizando la AAO* de *E. coli*).

5.1. Reacción de reducción

El estudio de la reacción de reducción de la AAO* se llevó a cabo haciendo reaccionar en un equipo de *stopped-flow*, bajo condiciones anaerobias, volúmenes idénticos de la enzima oxidada con cuatro sustratos diferentes: alcoholes *p*-anisílico, veratrílico y 3-cloro-*p*-anisílico y *p*-anisaldehído.

5.1.1. Reducción por alcohol *p*-anisílico

La cinética de reducción de la AAO* por este sustrato se analizó mezclando la enzima oxidada a concentración 6 μM con alcohol *p*-anisílico 36, 72, 108 y 144 μM (concentraciones finales en experimentos diferentes). El trazo cinético obtenido con la concentración más baja de sustrato se ajustó a un proceso exponencial de primer orden, que indica una reacción monofásica. Para concentraciones mayores los trazos cinéticos se ajustaron a una función doble-exponencial que indicaría un proceso bifásico, en el cual la reacción rápida transcurre dentro de los primeros 100 ms (Fig. 25A). Las constantes cinéticas observadas ($k_{1,obs}$) para este primer proceso (rápido) mostraron una dependencia de la concentración de sustrato llegándose a alcanzar la saturación (Fig. 25B). Este resultado sugiere la formación de un complejo enzima-sustrato y puede ser interpretado utilizando la ecuación 1, donde k_2 representa la constante de reducción o transferencia electrónica de la flavina :



Tal como describieron Strickland et al. (1975), asumiendo las condiciones de equilibrio $k_2 \gg k_{-2}$, es posible calcular la constante de disociación (k_d) como la relación k_{-1}/k_1 . Las constantes k_2 y k_d pueden ser obtenidas a partir de la pendiente y el punto de intersección en abscisas de la representación de "dobles recíprocos" de la k_{obs} frente a la concentración de sustrato (Fig. 25B, recuadro). Los valores obtenidos fueron de 33,7 μM para la k_d y de 303 s^{-1} para la k_2 .

El segundo proceso no había finalizado tras 500 ms de medida y las $k_{2,obs}$ durante este tiempo fueron del orden de 3 s^{-1} (Fig. 25A). La dependencia de la concentración inicial de alcohol y el hecho de que la AAO muestre también actividad oxidasa sobre aldehídos aromáticos (ver sección 3.1.2) sugirieron que este segundo proceso lento podría corresponder a la oxidación y/o interacción con el *p*-anisaldehído formado enzimáticamente. La primera hipótesis se vio reforzada por los resultados de cinética rápida durante la reducción de la AAO* por *p*-anisaldehído presentados más abajo.

Resultados

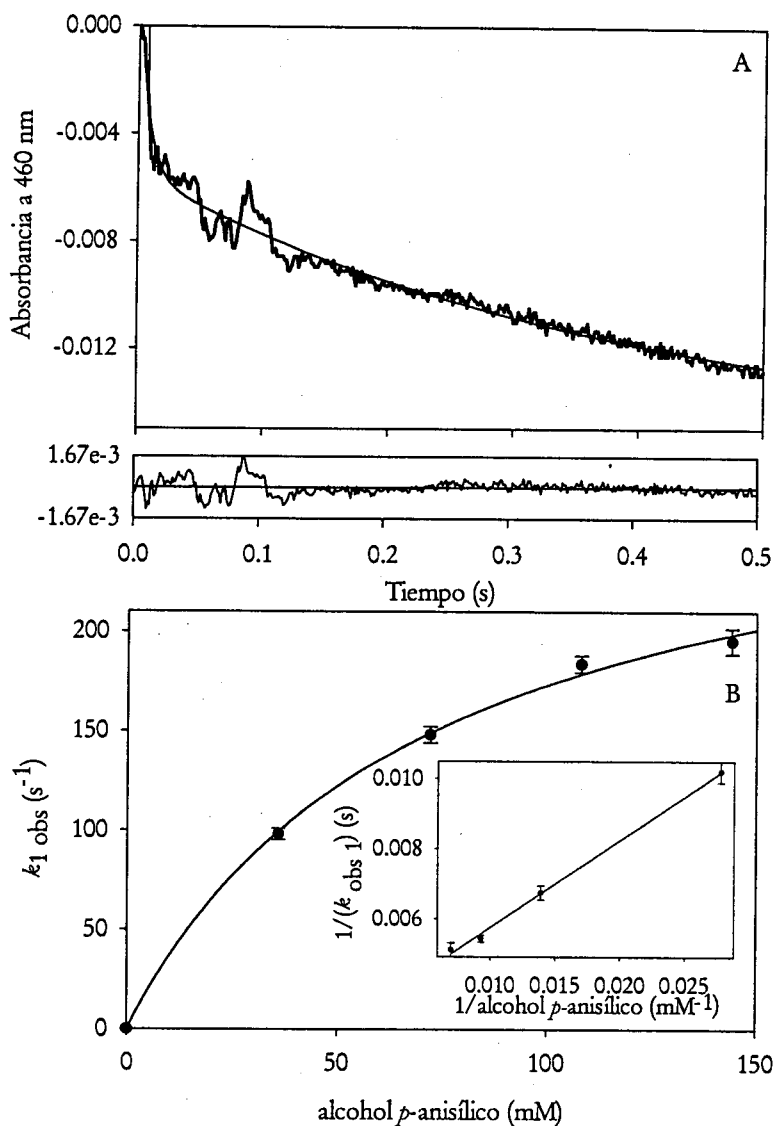


Figura 25. Reducción de la AAO* por alcohol *p*-anisílico. A. Trazos cinéticos obtenidos con 108 μM de sustrato durante 500 ms. El trazo grueso corresponde a los puntos experimentales y el trazo fino al ajuste teórico. B. Dependencia de los valores de k_{obs} de la concentración de alcohol *p*-anisílico. En el recuadro se muestra la representación de "dobles recíprocos". Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 100 mM de pH 6, a 25°C con 6 μM de enzima oxidada cuya reducción se siguió a 460 nm.

5.1.2. Reducción por alcohol 3-cloro-*p*-anisílico

Los ensayos de cinética rápida durante la reducción de la AAO* por este sustrato se realizaron mezclando 4 μM de AAO* oxidada con 27, 48, 72 y 96 μM de alcohol 3-cloro-*p*-anisílico (concentraciones finales). Las curvas obtenidas mostraron nuevamente la reducción del FAD a 460 nm, ajustándose a ecuaciones doble-exponenciales para las 3 primeras concentraciones ensayadas. Este resultado permite describir la reacción global como un proceso en dos fases. La primera, de menor amplitud que la segunda, es una reacción rápida cuya $k_{1,obs}$ depende de forma lineal de la concentración de sustrato, sin llegar a alcanzarse la saturación en el rango ensayado (Fig. 26). El segundo proceso resultó mucho mas lento e independiente de la concentración de sustrato, presentando valores de $k_{2,obs}$ de 0.64 s^{-1} .

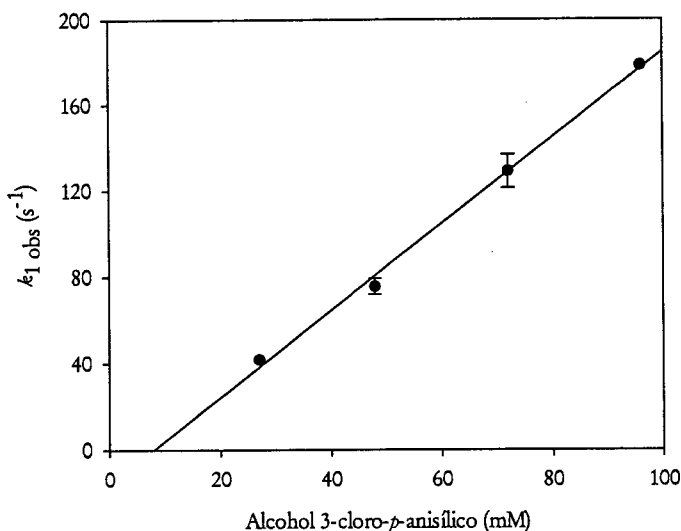


Figura 26. Dependencia de los valores de k_{obs} (para la reducción de la AAO*) de la concentración de alcohol 3-cloro-*p*-anisílico. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 100 mM de pH 6, a 25°C , utilizando alcohol 3-cloro-*p*-anisílico a distintas concentraciones y 4 μM de enzima cuya reducción fue seguida a 460 nm.

Al igual que en el caso anterior los datos cinéticos de la primera reacción fueron analizados usando el procedimiento descrito por Strickland et al. (1975). Así, en la representación de dobles recíprocos el ajuste fue lineal

Resultados

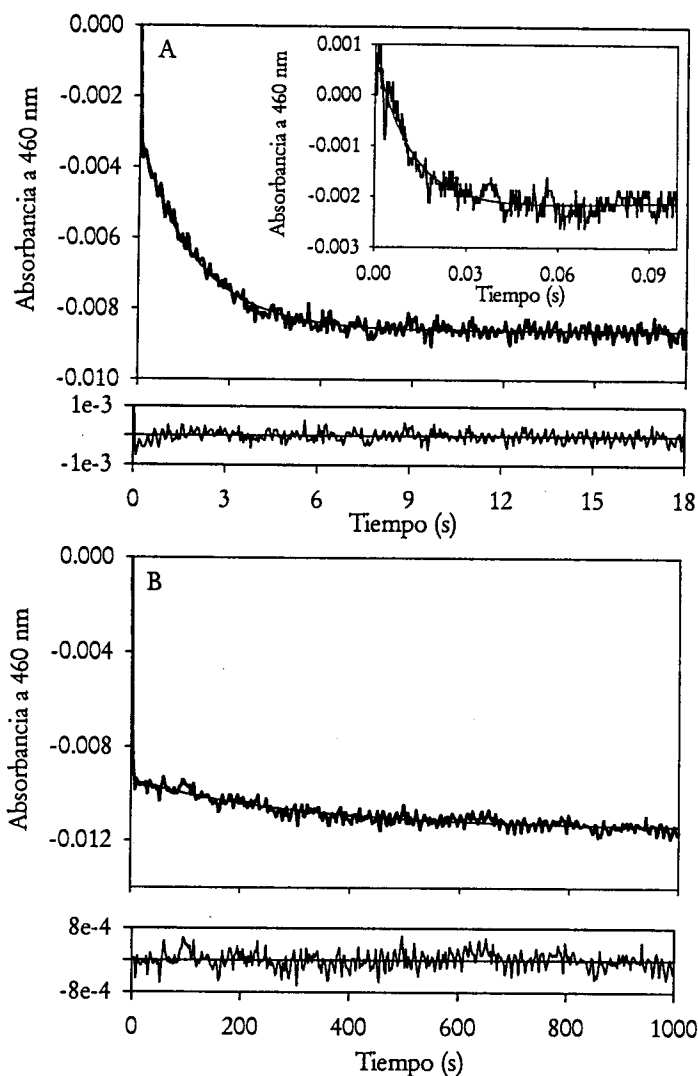
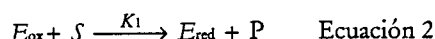


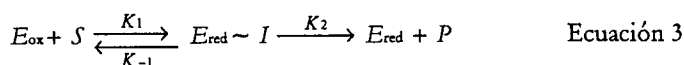
Figura 27. Trazos cinéticos de reducción de la AAO* por alcohol 3-cloro-*p*-anisílico. Se muestra el proceso bifásico de reducción por el alcohol a una concentración 72 μM en tres rangos de tiempo diferentes (0.1, 18 y 1000 s). Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 100 mM de pH 6, a 25°C, utilizando 4 μM de enzima cuya reducción fue seguida a 460 nm. El trazo grueso corresponde a los puntos experimentales y el trazo fino al ajuste teórico.

pasando por el origen (dato no mostrado). Este resultado puede justificarse si asumimos que k_{-1} es muy pequeño y $k_2 \gg k_{-1}$ (S), lo que supondría que la

cantidad de complejo E_{ox} -S sería despreciable. La constante k_1 calculada para el proceso así descrito sería $1,78 \mu M^{-1} s^{-1}$. Bajo este supuesto la reacción de reducción con este sustrato podría explicarse por la Ecuación 2.



Otra interpretación de los resultados, teniendo en cuenta las dos fases observadas durante la oxidación del alcohol 3-cloro-*p*-anisílico, sería asumir un proceso donde la primera reacción representaría un proceso reversible de reducción de la flavina (Ecuación 3) como se ha descrito para la reducción de la vainillil-alcohol oxidasa por *p*-etilfenol (Fraaije *et al.*, 1998), en el cual la mayor parte de la flavina estaría en su forma oxidada ($k_1 < k_{-1}$), de ahí la pequeña amplitud de la reacción observada para esta primera fase. Si tenemos en cuenta la fracción de enzima oxidada ($k_1/(k_{-1}+k_2)$) presente al final de la primera fase de reducción, se puede calcular k_1 y k_{-1} , definiendo la constante aparente de reducción de esta fase como ($k = k_1+k_{-1}$). Los valores que se obtienen para k_1 y k_{-1} son $53.6 s^{-1}$ y $125.0 s^{-1}$ respectivamente. La segunda fase reflejaría el decaimiento del complejo entre la enzima reducida y el producto o un intermediario en la reacción (E_{red} -I). La posible formación de compuestos intermediarios había sido ya observada en los ensayos de ^{19}F NMR con el alcohol *m*-fluorobencílico (sección 3.1.2), que al igual que el 3-cloro-*p*-anisílico, incluye un sustituyente (Cl/F) desactivante del anillo de benceno.



El análisis de la cinética de reducción de AAO* a la concentración de alcohol 3-cloro-*p*-anisílico más elevada ($96 \mu M$) mostró trazos cinéticos que se ajustaron a ecuaciones triple-exponenciales (ver Fig. 27). Las dos primeras fases presentaron cinéticas similares a las observadas a concentraciones inferiores, mientras que la tercera nueva fase resultó considerablemente mas lenta con una $k_{3,obs}$ de $0.0336 s^{-1}$. Al igual que en el caso del alcohol *p*-anisílico se sugiere la oxidación y/o interacción con el aldehído producido por la AAO* como la responsable de esta tercera fase.

5.1.3. Reducción por alcohol veratrílico

Resultados

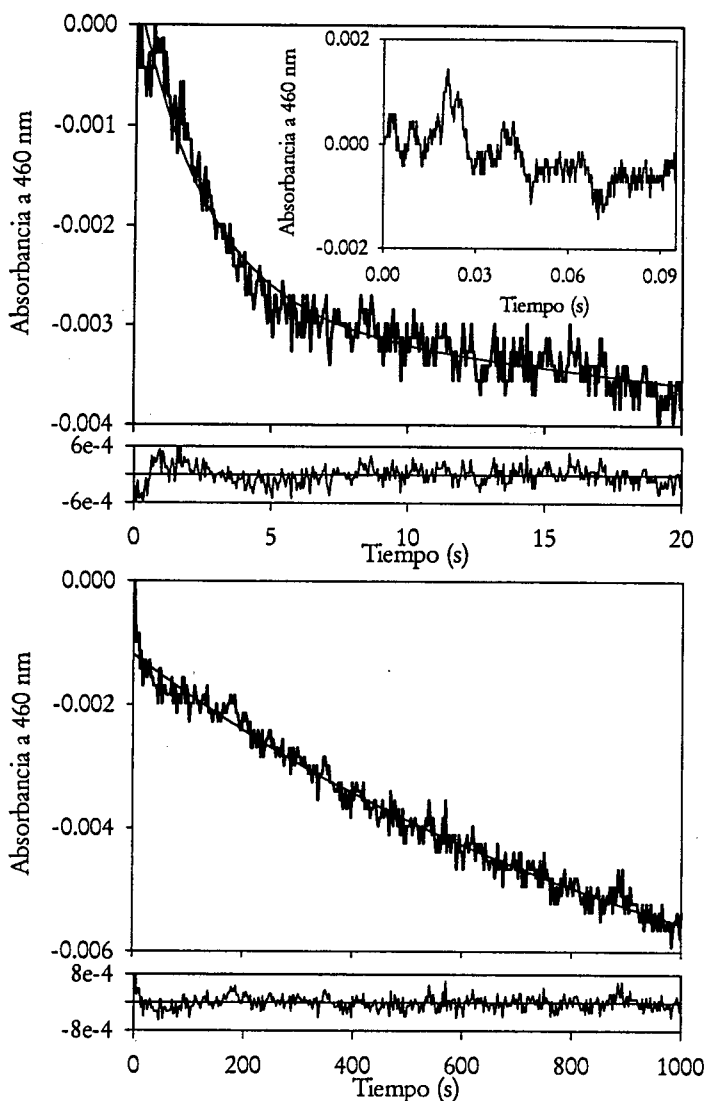


Figura 28. Trazos cinéticos para la reducción de la AAO* por alcohol veratrílico. Se muestra la reducción de la enzima por el alcohol (168 μM) a tres escalas de tiempo diferentes (0.1, 20 y 1000 s). Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 100 mM de pH 6 a 25°C, utilizando 4 μM de enzima cuya reducción se estimó a 460 nm. El trazo grueso corresponde a los puntos experimentales y el trazo fino al ajuste teórico.

La reducción de la AAO* por el alcohol veratrílico pudo ser ajustada a

un proceso doble-exponencial (Fig. 28). La primera reacción presentó una $k_{1,obs} \geq 0.28 \text{ s}^{-1}$ y ocurrió tras unos 0.10 s sin cambios de absorbancia. Estos primeros milisegundos podrían deberse a la formación o adaptación del complejo enzima-sustrato, tras el cual tendría lugar la transferencia de electrones y oxidación del alcohol veratrílico. Este proceso no se observó en las cinéticas anteriores posiblemente debido a la mayor afinidad de la AAO* por aquellos sustratos, lo que daría lugar a una mayor velocidad de formación del complejo. A continuación, se observó un segundo proceso que sugirió la interacción y/o oxidación del veratraldehído. Esta reacción presentó una mayor amplitud que la observada para el resto de los alcoholes ensayados y una $k_{2,obs} \geq 0.003 \text{ s}^{-1}$.

5.1.4. Reducción por *p*-anisaldehído

Para comprobar experimentalmente que la reducción de la AAO* por los aldehídos aromáticos podía ser observada mediante mezcla rápida con flujo detenido, siendo responsable de la última fase en las reacciones de reducción descritas anteriormente, se analizó la reducción de la AAO* ($4 \mu\text{M}$) por *p*-

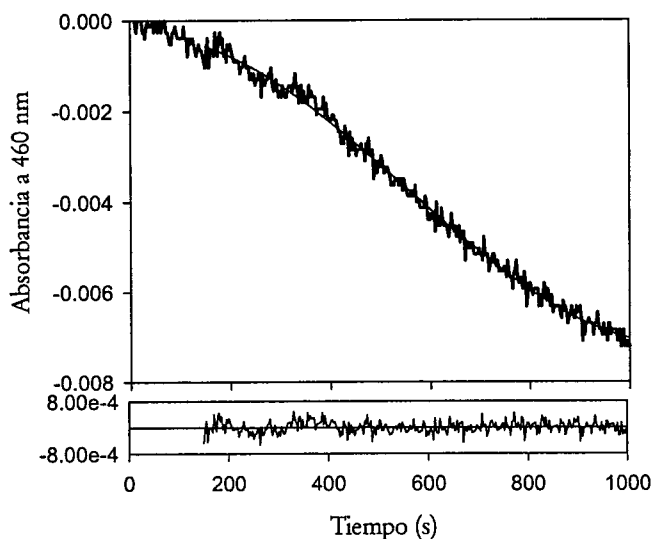


Figura 29. Trazo cinético para la reducción de la AAO* por anisalaldehído. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 100 mM de pH 6, a 25°C, con 144 μM de aldehído y 4 μM de enzima, cuya reducción se estimó a 460 nm. El trazo grueso corresponde a los puntos experimentales y el trazo fino al ajuste teórico.

anisaldehído 144 y 500 μM , en condiciones similares a las utilizadas para los alcoholes (Fig. 29). Al comienzo de la reacción se observó una fase de adaptación de unos 150 segundos (tiempo a partir del cual se realizó el ajuste teórico), para posteriormente comenzar una lenta reacción que permanecería inacabada a los 1000 s de producirse la mezcla, con valores de $k_{1,obr}$ de 3.5×10^{-4} y $9.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para 144 y 500 μM de *p*-anisaldehído respectivamente. Esta reacción resultó ser un orden de magnitud más lenta que la observada en la última fase de la reacción con los alcoholes utilizando la misma concentración de enzima. Esto podría deberse a la mayor accesibilidad de los aldehídos formados enzimáticamente (comparados con el *p*-anisaldehído añadido a la reacción) ya que éstos se generan en el entorno de la proteína y la formación del complejo enzima-sustrato debe verse facilitada.

5.2. Cinética de la reoxidación por el O_2

El proceso de reoxidación de la AAO* se estudió mediante *stopped-flow*, previa fotorreducción de la enzima en presencia de 5-deazariboflavina. Tal

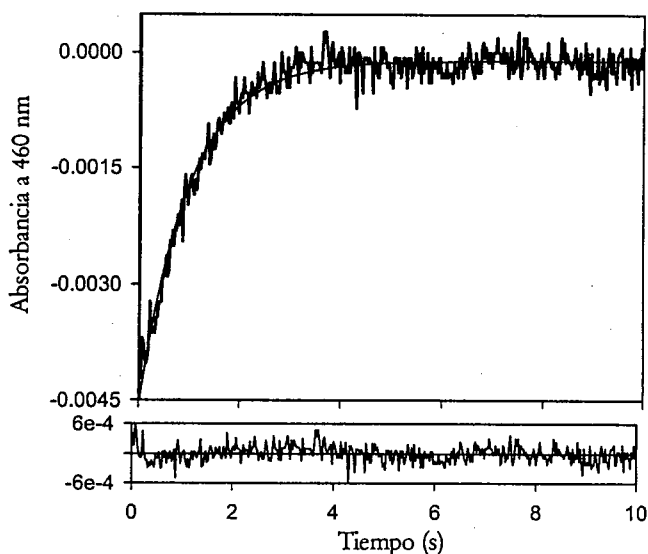


Figura 30. Trazo cinético para la reoxidación de la AAO* por el O_2 . La AAO* fotorreducida (2 μM) fue mezclada bajo condiciones anaerobias con tampón fosfato 100 mM de pH 6 saturado con O_2 (por aireación previa). El trazo grueso corresponde a los puntos experimentales y el trazo fino al ajuste teórico.

como se muestra en la Fig. 30, la reoxidación de la AAO* por el O₂ produjo un incremento de absorbancia a 460 nm ajustándose la curva a una ecuación exponencial de primer orden. Este proceso monofásico presentó una k_{obs} de $0.90 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$.

6. Estudios estructurales de la AAO

Este apartado incluye el análisis de la estructura primaria de la AAO con objeto de identificar motivos conservados en otras oxidorreductasas, la determinación experimental de su estructura secundaria mediante dicroísmo circular, el análisis de la estructura terciaria (tras modelado por homología y *docking* con diferentes alcoholes) con la finalidad de identificar residuos potencialmente implicados en la catálisis y reconocimiento de sustratos, y los estudios de mutagénesis dirigida encaminados a comprobar que dichos residuos son funcionales.

6.1. Estructura primaria: Comparación con otras oxidorreductasas

La secuencia de la AAO (deducida a partir del correspondiente cDNA) está compuesta por 593 aminoácidos, incluidos 27 aminoácidos que componen su péptido señal (entrada AFO64069 de GenBank) (Varela *et al.*, 1999). Al realizar una búsqueda BLAST (PBLAST) en el servidor del NCBI (sobre un total de 2 715 099 secuencias) utilizando la secuencia de la AAO madura las mayores identidades de secuencia (superiores al 30%) se obtuvieron para colina deshidrogenasa, polietilenglicol deshidrogenasa (EC 1.1.99.20), alcohol deshidrogenasa (aceptor) (EC 1.1.99.8) y sorbosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.12), todas ellas de origen bacteriano. También aparecieron diferentes proteínas hipotéticas incluyendo varias de origen fúngico (de *Gibberella*, *Aspergillus*, *Magnaporthe*, *Podospora* y *Neurospora*).

Cuando la búsqueda BLAST se orientó a las proteínas de las que se conoce la estructura cristalográfica las que mostraron la mayor identidad de secuencia con la AAO fueron la glucosa oxidasa de *A. niger* (Frederick *et al.*, 1990) y *P. amagasakiense* (Kiess *et al.*, 1998) y la hidroxinitrilo liasa de almendra (*Prunus amygdalus*) (Dreveny *et al.*, 2001). En el alineamiento múltiple de las secuencias maduras de estas tres enzimas (Fig. 31), la AAO presentó respectivamente un 29, 28 y 21% de identidad con la glucosa oxidasa de *A. nidulans* y *P. amagasakiense* y la hidroxinitrilo liasa. La glucosa oxidasa pertenece a la familia de oxidorreductasas GMC, que debe su

Resultados

nombre a la glucosa oxidasa y deshidrogenasa, metanol oxidasa y colina deshidrogenasa (Cavener, 1992). El alineamiento múltiple presentado en la

		--A3--		--H1--				
AAO	-----	ADFDYVVVGAGNAGNVVAARLTEDFDVSV				29		
GOX_pe	--YLPAAQQIDVQSSLLSDPSKVAGKTYDYIIAGGGLTGLTVAAKLTENPKIKV					51		
GOX_as	-----	SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLTGLTTAARLTENPNISV				46		
Hnll	LATTSDHDFSFLYSFAYDATDLELEGSYDYVIVGGGTSGCPLAATLSEK--YKV					51		
		DY	G G G	RL	V			
	A2-		--D4-		--D5--			
AAO	LVLEAGVSDENVVLGAEAPLLAPGLVPNSIFDWNVITTAQGYNGRSIAYPRGR					82		
GOX_pe	LVLEKGFYESNDGAIIEDPNAYGQIFGTTVDQNYLTIVPLIN--RTNNIKAGK					102		
GOX_as	LVIESGSYESDRGPIIEDLNAYGDI FGSSVDHAMETVELAT--NQATLIRSGN					98		
Hnll	LVLERGSLPTAYPNVLT---ADGFVYNLQQEDDGKTPVERFVSEDGIDNVRGR					101		
	E G							
		-E4-		--H2----		--H3----	-E1--	
AAO	MLGGSSSVHYMVMRGSSTEDFDRYAAVTCDEGWNWDNIQQFVRKNEMVVPFAD							135
GOX_pe	GLGGSTLINGDSWTRPDKVQIDSWEKVFGMEGWNWDNMFEYMKKAFAARTPTA							155
GOX_as	GLGGSTLVNGGTTWTRPHKAQVDSWETVFCNEGWNWDNVAAYSLQAEARAPNA							151
Hnll	VLGGTSIIINAGVYARAN-----TSIYSASSVDWD-----MDLVNQTY							138
	LGG	N	R	D W	W	E		
	----	H4----		----	E2----		----	H5----
AAO	NHNTSG-EPHFAVHGTVNGSVSISLPGFPTPLDDRVLATTQEQSE-EFFFNPD							186
GOX_pe	AQLAAGHSFNATCHGTNGTVQSGARDNGQFWSPIKALMNTVSGALGVFVQQDF							208
GOX_as	KQIAAGHYENASCHGVNGTVHAGPRDTGDDYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDF							204
Hnll	EWVEDTIVYKPNSSQSWQSVTKTAFLEAG-----VHPNHGF							173
	H G						DF	
		-C1-	-E3--		--H6----		--A1--	-B1--
AAO	GTGHPLEISWSIASVG-NGQRSSSTAYLRPAQSRPNLSVLINQVITKLNVSG							238
GOX_pe	LCGHPRGVSMIMNLDENQVRVDAARAWLLPNYQRSNLEILTGMVGVFLFKQ							261
GOX_as	GCSDPHGVSMFPNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRPNLQVLTGQYVGVLLSQ							257
Hnll	SLDHEEGTRITGSTFDNKGTR--HAADBLNKGNSNNLRVGVHSAVETIIFSN							224
	G	R	AR	L				
		-B2--		--A4----		--H7----		----
AAO	TTNGLPAFRCEVFAEQEAP-TTIVCAKKEVLSAGSVGTPILLQLSGIGDEN							290
GOX_pe	TAS-GPQAVGVNFGTNKAV--NFDVFAKHEVLLAAGSAISPLTILEYSGIGLKS							311
GOX_as	NGT-TPRAVGVEFGTHKGN--THNVYAKHEVLLAAGSAVSPITILEYSGIGMKS							307
Hnll	APG--LTATGTVTRDSNGTPHQAFVRSKGEVIVSAGTIGTPTOLLILLSGVPFS							275
				G	P	L	SG G	
	-H7--		-D1-		-C5--		----	-H8--
AAO	DLSSVGIDTIVNPNPSVGRNLSHLLLPAAFFVNSNQTFDNIFRDSSEFNVDLD							343
GOX_pe	VLDQANVTQLLDLP-VGINMQDQTTTIVSSRASSAGAGQGQAVFFANFTETFG							363
GOX_as	ILEPLGIDTIVVDLP-VGLNLQDQTTATVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFG							359
Hnll	YLSSLNIPVVLSHPEYVCGFLHNPNNFIN--ILPPNPIEPTIVTVLGISNDPFY							326
	L	LP	G N					

Figura 31. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la AAO y otras oxido-reductasas. AAO, GOX_as, GOX_pe y Hnll son las secuencias (proteínas maduras) de la AAO de *P. eryngii*, la glucosa oxidasa de *A. niger* y *P. amagasakiense*, y la hidroxinitrilo liasa de *P. amygdalus* respectivamente (de estas tres últimas oxido-reductasas se conoce la estructura cristalográfica). En fondo negro se muestran los residuos conservados, en la primera línea se indica la posición de hélices α y estructuras β , y en la última línea los residuos característicos de la familia GMC (Cavener, 1992). Alineamiento múltiple realizado en el servidor *SDSC Biology Workbench* (Thompson *et al.*, 1994).

Resultados

		-----H9-----	-----H9'----	-----H10-----		
AAO		QWTNTRTGPLTALIANHLAWLRLPNSISFQTFDPDPAAGPNSAHWETIFSNQW			396	
GOX_pe		DYAPQARDLNTKLDQWAEETVARGG-----FHNVTALKVQYENYRNWLLDED			411	
GOX_as		DYSEKAHELNTKLEQWAEAAVARGG-----FHNTTALLIQYENYRDWIVNHN			407	
Hn11		QCSFSSLPFTTPPFG-----FFGSSSYPLPNSTFAHFAS---			360	
		-C3--	---C4--	---D2---	---D3--	-H11-
AAO		FHPAIPRPDTGSFMSVTNALISPVARGDIKLATSNEFDKPLIN-POYLSITEFD				448
GOX_pe		VAFAEELFMDTEGKINFDLWDLIPFTRGSGVHILSSDEYLWQFANDPKFFLNEDF				464
GOX_as		VAYSELFLDTAGVASFDVWDLIPFTRGYVHILDKDPYLHHPAYDPOYFLNELD				460
Hn11		-----KVAGPLSYGSLTLKSSSNVRVSPNVKFNYYSNITDLSHCVSGMKK				405
			P	RG	P	E D
		-----H11-----	---C6---	-----H12-----		
AAO		IFTMIOAVKSNLRFLSGQAWADFVIRPFDP--RLRDEPTDDAAIESYIRDMANT				499
GOX_pe		LLGQAAASKLARDLTSQAMKEYFAGETLPGYNLVQNATLSQWSDYVLQNFRRP				517
GOX_as		LLGQAAATQLARNISNSGAMQTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYTPYHFRP				513
Hn11		IGELLSTDALPKYKVEDLPGVEGFNIGIP--LPKDOTDDAAFFETFCRESVAS				456
		R				
				-A5-		--H13-
AAO		IRHPVGTASMSPRGASWGVVDPDLKVKGVQGLRIVDGSILEFAPNAHTQSPIY				552
GOX_pe		NWHAVSSCSMSR-ELGGVVDATAKVYGTQGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFY				569
GOX_as		NYHGVGTCSMMPK-EMGGVVDNAARVYGVQGLRVIDGSIPPTQMSHVMTVFY				565
Hn11		YWHYHGCLVG-----KVLDGDFRVITGINALRVVDGSTFTYTPASHPQGFYL				503
		H	M	V	V G	L V D S P
		--H13---				
AAO		LVGKQGADLIKADQ-----				566
GOX_pe		GMALKVADAILDDYAKSA-----				587
GOX_as		AMALKISDAILEDYASMQ-----				583
Hn11		MLGRYVGIKILQERSASDLKILDSLKSAASLVL				536
		K				

Figura 31 (continuación).

Fig. 31 permitió identificar numerosos residuos conservados en las tres proteínas, la mayoría de los cuales pertenecen al dominio de unión del FAD. Entre los residuos conservados se incluyen las siguientes secuencias consenso típicas de la familia GMC, todas ellas situadas en el dominio de unión del FAD:

- La primera región conservada (residuos 4-35 de la AAO) es el dominio $\beta\alpha\beta$ de unión del ADP, que contiene el motivo D(P)xV(I/L)V(I)xG xGxxG(A)xxxAxR(K/T)LxxxxxxxV(T)xxL(I/V)ExG.
- La segunda región conservada corresponde a los residuos 268-287 de la AAO: VxLxAG(S)S(ATP)xxT(S)P(S)xL(VMI)xxxSGI(VML)G (*Signature 2 Prosite PS000624*).
- El tercer motivo conservado corresponde a los residuos 518-540 de la AAO: V(A)xDxxxxVxGxxG(N)LRI(V/R)xDxSxxP.
- Los residuos 81-104 de la AAO forman el cuarto motivo conservado: G(A)K(RCN)xL(IV)GGG(GT)xxV(LIM)NG(AFY)G(ML)xM(FWYA)xR(TE)P(GA)xxxxxD(NESH) (*Signature 1 Prosite PS000623*).

La secuencia de la AAO incluye 7 potenciales sitios de glicosilación en las posiciones 62-64, 138-140, 151-153, 222-224, 309-311, 325-327 y 369-371. Tres de ellos coinciden con los sitios de glicosilación confirmados en el modelo cristalográfico de la glucosa oxidasa (entrada 1GAL de PDB).

En la secuencia de la AAO aparecen tres residuos de cisteína, dos de los cuales (C275 y C289) podrían formar un puente disulfuro, aunque su posición no coincide con el único puente disulfuro existente en la glucosa oxidasa de *A. niger* (entre C164 y C206).

6.2. Análisis de la estructura secundaria por dicroísmo circular

En la Fig. 32 se muestran los espectros de dicroísmo circular de la AAO* de *E. nidulans* y de *E. coli*. La semejanza entre ambos espectros indica que las dos enzimas recombinantes poseen la misma estructura secundaria y demuestra el correcto plegado *in vitro* de la AAO* expresada en *E. coli*. Las dos bandas negativas de magnitud similar sobre los 222 y 209 nm corresponden al espectro de dicroísmo circular característico de las hélices α , indicando el predominio de este tipo de estructura en la AAO. El modelo estructural de la AAO realizado por homología sugirió la existencia de 15 hélices α , y 5 láminas β tal como se describe a continuación.

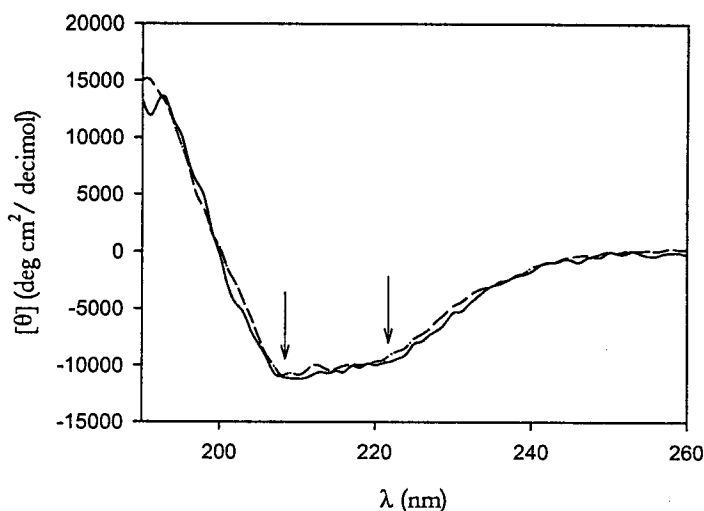


Figura 32. Espectro de dicroísmo circular de la AAO*. El espectro se realizó en tampón fosfato 10 mM de pH 5.5, utilizando 0.7 mg/mL de AAO* de *E. nidulans* (—) y de *E. coli* (---) en una cubeta de 1 mm de paso óptico.

6.3. Estructura tridimensional tras modelado por homología

El modelo teórico de la AAO (AAO (entrada 1QJN de PDB) está basado en la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa de *A. niger* (Hecht *et al.*, 1993). En la Fig. 33 se indica la posición de las diferentes láminas y hélices sobre la secuencia de la AAO. Su nomenclatura está basada en la de la glucosa oxidasa.

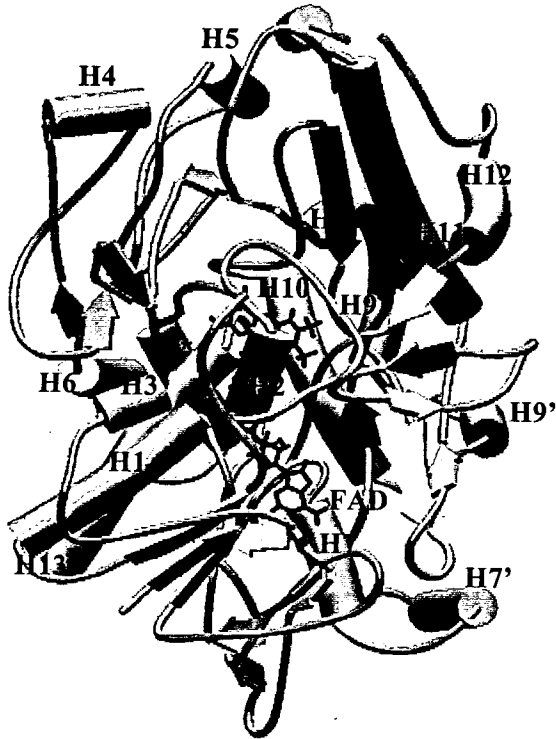
La AAO constaría de dos dominios estructurales: el dominio de unión del FAD y el dominio de unión del sustrato (Fig. 33) descritos a continuación, caracterizados por la presencia de una gran lámina β en cada uno de ellos. También puede identificarse una región intermedia entre ambos dominios. La AAO presenta una topología semejante a la de otras flavoenzimas y puede ser descrita haciendo referencia a la familia de oxidorreductasas GMC (Kiess *et al.*, 1998).

6.3.1. Dominio de unión del FAD

El dominio de unión del cofactor (1 molécula de FAD) está compuesto principalmente por las láminas A (cinco grandes hebras- β en disposición paralela) y B (dos hebras- β), y cuatro hélices- α (H1, H7, H7' y H13). Ésta es una zona altamente conservada donde se puede observar el motivo $\beta\alpha\beta$ (A3-H1-A2) responsable de la unión del FAD a la AAO, y conservado en las flavoproteínas (Wierenga *et al.*, 1983; 1986). El extremo N-terminal y C-terminal de la AAO se encuentran en la superficie del dominio de unión del FAD.

El cofactor en la AAO se encuentra en la zona central de la molécula. La Fig. 34 muestra los residuos que rodean al FAD de la AAO de *P. eryngii*. Algunos de estos residuos están implicados en la unión del FAD aunque no todos interaccionan directamente con el cofactor. Muchos de ellos se encuentran conservados en la familia GMC de oxidorreductasas y/o en la hidroxinitrilo liasa: G9, G11, G14, A19, L21, L32, E33, G35, G65, G81, G86, S88, V231, A272, S274, D535, y S537 de la AAO. Las principales interacciones entre el FAD y la AAO serían a través de 17 puentes de hidrógeno con los residuos: N12, A13, G14, L32, E33, M83, S88, Q230, S274, G385, T548 y G549.

A



B

Lámina C

Lámina E

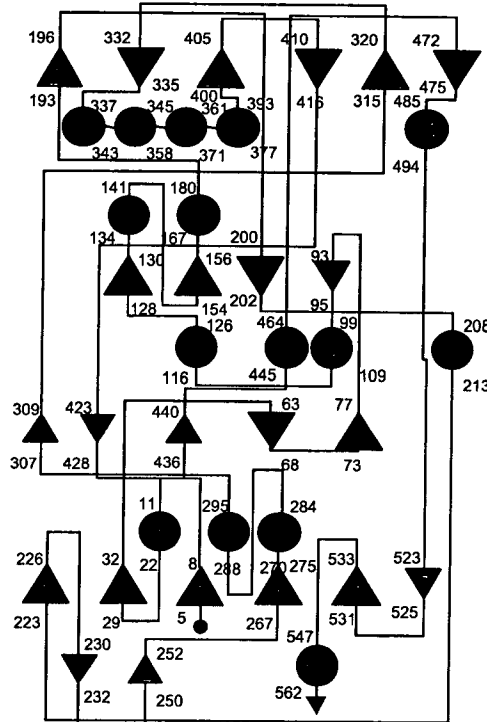
Lámina D

Lámina A

Lámina B

Dominio
de unión
del sustrato

Dominio
de unión
del FAD



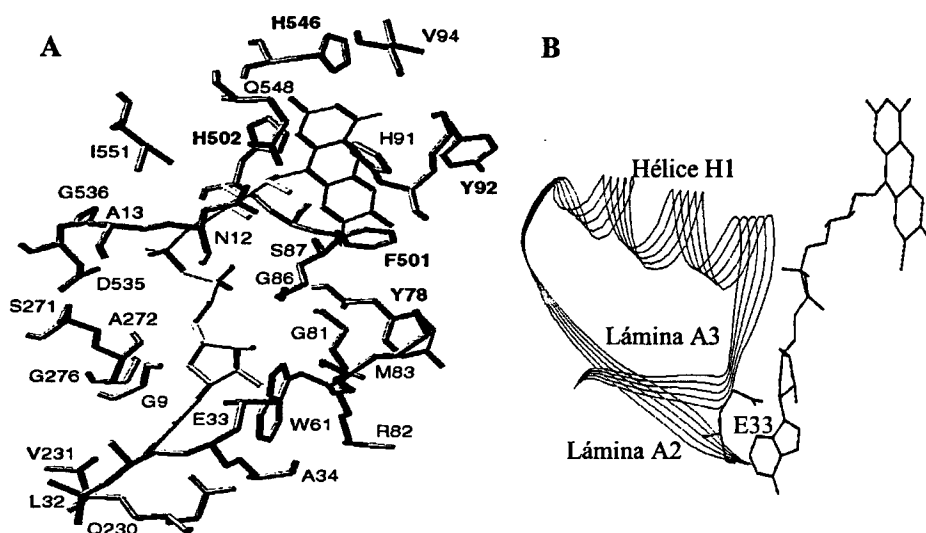


Figura 34. Entorno del FAD de la AAO. A. Residuos próximos al cofactor (los residuos conservados en la glucosa oxidasa se muestran en negrita). B. Motivo $\beta\alpha\beta$ de unión del FAD.

6.3.2. Región intermedia

Esta región está formada en la AAO por la lámina E (4 hebras β) y por 4 hélices α (H2, H3, H4, H5, H6 y H11). Las hélices H2, H3 y H11 están estructuralmente conservadas en todas las oxidorreductasas de la familia GMC. La hélice H11 en la AAO, aparece en disposición similar a la de la glucosa oxidasa, interaccionando con la lamina C a través de una serie de residuos altamente conservados, también en la AAO: el residuo A455 de la AAO implicado en contactos hidrofóbicos con las hebras C4 y C3, y los residuos hidrofóbicos V306, G307, L281 y I286 de la AAO responsables de mantener la integridad estructural de esta región en otras GMC (Hecht *et al.*, 1993). En las hélices H2 y H3 y la lamina E hay también una serie de

Figura 33 (Página anterior). Modelo teórico de la AAO de *P. eryngii* (entrada PDB: 1QJN). A. Estructura tridimensional mostrando el FAD, 15 hélices α y 5 láminas β . B. Diagrama topológico de la estructura secundaria. Los elementos del dominio del FAD se muestran en rojo, los del dominio de unión del sustrato en verde y los de la región intermedia en azul.



residuos conservados en la AAO y la glucosa oxidasa (D104, V109, G111, E113, G115, W116, N117, W118, D119, N120, E129, H149 y G153 de la AAO). Algunos de ellos podrían conectar con los dominios de unión del FAD y de unión del sustrato descritos en los apartados anterior y siguiente, respectivamente.

6.3.3. Dominio de unión de sustratos

El dominio de unión de sustratos de la AAO está formado por las láminas C (6 hebras β) y E (4 hebras β) en disposición antiparalela y las hélices H8, H9, H9', H10 y H12. A pesar de la poca identidad de secuencia en esta región, el dominio de unión de sustratos de la AAO muestra una topología general similar al de otros miembros de la familia GMC. La distribución de hélices α en esta región es parecida, aunque la glucosa oxidasa no presentar las hélices H7' y H9'.

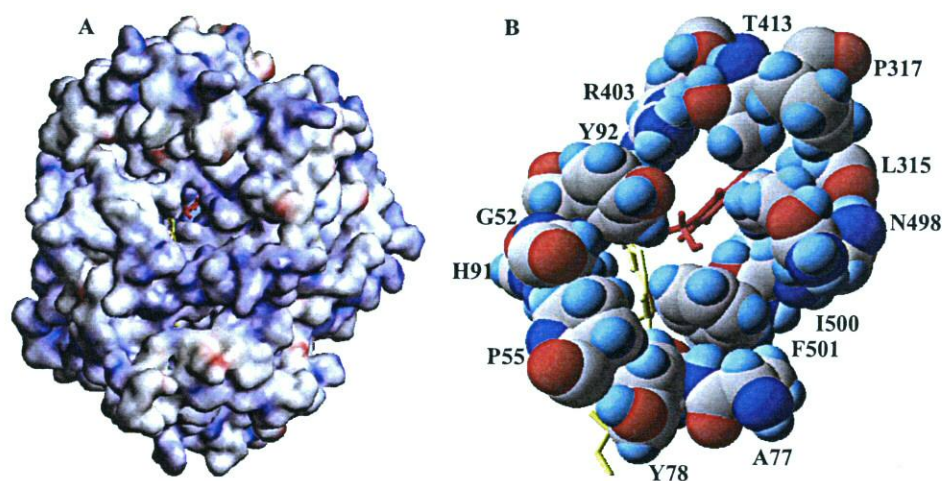


Figura 35. Superficie de acceso de solvente en el modelo molecular de la AAO. A. Aspecto globular de la enzima. A través del canal de acceso se puede observar en el interior de la proteína el FAD (en amarillo) y el alcohol veratrílico (en rojo). B. Detalle del canal de acceso.

La AAO, al igual que otras flavoproteínas, muestran en la superficie un canal de acceso al FAD y al centro activo de la enzima (Fig. 35). La AAO

tan solo presenta dos residuos conservados de los siete que componen el centro activo de la glucosa oxidasa (Wohlfahrt *et al.*, 1999). Estos dos residuos son H502 y H546, que ocupan la misma posición que los correspondientes residuos de la glucosa oxidasa (H516 y H559) situados en las proximidades del anillo de flavina. El N^{ε2} de H502 se encuentra a una distancia del N1, C4a y c10a del FAD de 3.8 Å, 3.8 Å y 3.4 Å, respectivamente. Desde el N^δ de H546 al N3 del FAD hay una distancia de 4.0 Å. La situación de estos dos residuos es bastante favorable para actuar como bases en la reacción de reducción de la enzima y como ácidos en la reacción de oxidación dentro del ciclo catalítico de la AAO (tal y como se comenta en el último apartado de la Discusión).

En la AAO junto a H502 se encuentra F501. En otras flavoenzimas (Mattevi *et al.*, 1996; 1997; Mizutani *et al.*, 1996; Schreuder *et al.*, 1989) se ha sugerido la implicación de residuos aromáticos próximos al anillo de flavina

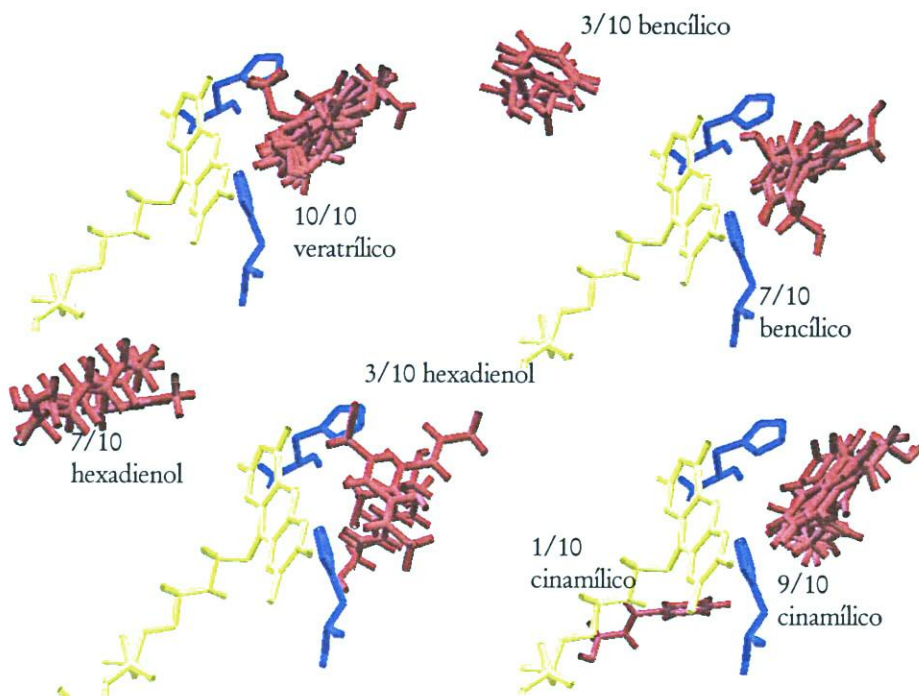


Figura 36. Resultados del *docking* de la AAO de *P. eryngii* con los alcoholes veratrílico, benzílico y *p*-anisílico y el 2,4-hexadien-1-ol. Se muestra parte del FAD (en amarillo), los residuos de histidina conservados (en azul) y las posiciones de diez moléculas de cada alcohol (en rojo).

en la unión de los sustratos (incluyendo compuestos aromáticos). De forma parecida, F501 así como Y78 y Y92, situados en la proximidad del anillo de flavina de la AAO, podrían formar parte del sitio de unión de sustratos aromáticos (o alifáticos poliinsaturados) a esta enzima.

6.4. Estudios de acoplamiento molecular (*docking*) con sustratos

Sobre el modelo teórico de la AAO descrito anteriormente se realizaron estudios de acoplamiento molecular (*docking*) con diferentes sustratos: alcoholes bencílico, veratrílico y *p*-anisílico y 2,4-hexadien-1-ol. Para ello se utilizó el programa AutoDock ver. 3 (Morris *et al.*, 1998). La simulación de las interacciones moleculares entre la AAO y los sustratos muestra como estos alcoholes se sitúan en el interior de la proteína al que se accede por el canal antes mencionado (Fig. 35A). En la Fig. 36 se muestran los resultados del *docking* con los diferentes alcoholes estudiados. Con la excepción del 2,4-hexadien-1-ol, la mayoría de las moléculas de sustrato se localizaron en las proximidades del N5 del anillo de flavina y de los residuos H502 y H546. En la Fig. 37 se muestran los residuos cercanos al sitio donde se ha localizado el sustrato y al anillo de flavina que podrían estar implicados en la actividad catalítica de esta enzima.

7. Estudios de mutagénesis dirigida

Los estudios de mutagénesis dirigida de la AAO estuvieron encaminados a confirmar los residuos que forman parte del bolsillo de unión a los sustratos y participan en la catálisis.

7.1. Diseño de los mutantes

Del modelo molecular de la AAO de *P. eryngii* y los resultados del *docking* descritos anteriormente, se dedujeron una serie de residuos potencialmente implicados en la actividad catalítica de esta enzima (Fig. 37). Las modificaciones mediante mutagénesis dirigida de los residuos de histidina H502 y H546, conservados en la glucosa oxidasa de *A. niger*, están encaminadas a probar su participación en la transferencia electrónica al anillo de flavina. En la glucosa oxidasa el residuo altamente conservado N107 está implicado en la unión del O₂ del anillo de flavina, siendo su

homólogo en la AAO un tercer residuo de histidina H91 cuyo papel será también identificado por mutagenesis dirigida.

Por otro lado, los residuos aromáticos Y78, F501 y Y92, por su proximidad al FAD y su naturaleza química podrían estar estabilizando la unión de los sustratos por interacciones de tipo hidrofóbico. Además, de los resultados del *docking* se dedujeron otra serie de residuos (I500, N498, L315, A415, I401 y R403) que por su naturaleza y localización en el bolsillo de unión de los sustratos, podrían también participar en la unión de éstos o estabilizar el mencionado bolsillo. Para todos estos residuos se diseñaron una serie de variantes cuyas características se describen a continuación.

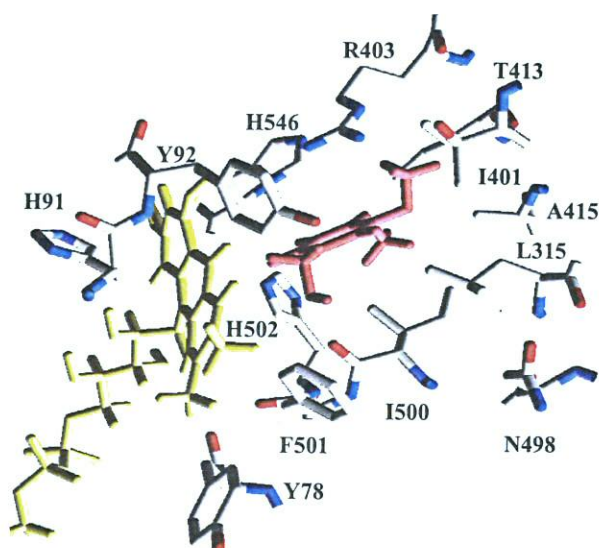


Figura 37. Identificación de los residuos situados en la proximidad del sustrato.

7.2. Construcción de las variantes de la AAO

Las variantes Y78A, H91S, Y92A, Y92F, L315A, I401A, R403S, F501A, F501F, H502L, H502S, H546L y H546S fueron obtenidas mediante mutagénesis dirigida utilizando el *kit QuikChange*[®] de Stratagene (Weiner *et al.*, 1994). Para ello, se diseñaron una serie de cebadores con los que, mediante amplificación por PCR de pALAAO*, se insertaron las mutaciones en el cDNA de la AAO. Tras una digestión selectiva del DNA

parental con la nucleasa *DpnI*, los plásmidos amplificados fueron aislados y secuenciados. Los plásmidos que incorporaron la mutación deseada y el resto de la secuencia amplificada correctamente, fueron utilizados para transformar *E. nidulans*.

7.3. Comparación de transformantes de *E. nidulans*

La expresión de los mutantes y obtención de las diferentes variantes se realizó de manera similar a la AAO* nativa (no mutada). Los plásmidos pALAAO* con las mutaciones deseadas fueron empleados como vector de expresión. Con ellos se transformaron protoplastos de *E. nidulans* *biA1*, *metG1*, *argB2* y se aislaron los transformantes que crecieron en ausencia de arginina.

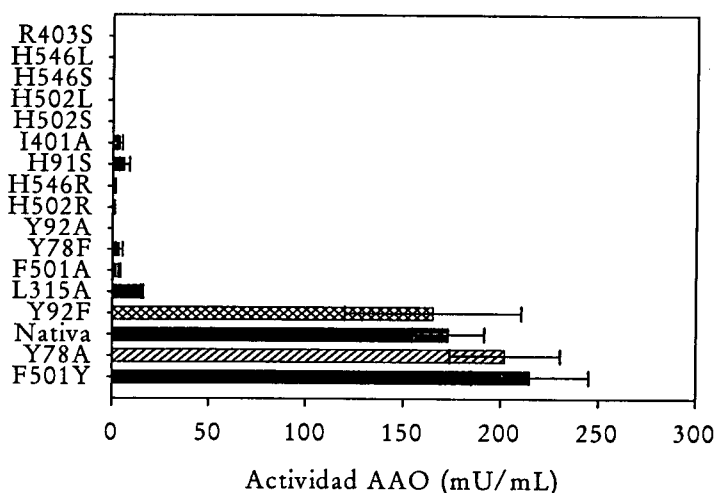


Figura. 38. Niveles de actividad AAO en cultivos de los transformantes de *E. nidulans* que contenían las diferentes mutaciones en el cDNA de la AAO. La actividad AAO fue medida en los líquidos de cultivo tras 48 h de incubación, utilizando alcohol veratrílico como sustrato (medias y límites de confianza del 95%).

Para cada mutante se seleccionaron una media de 10 clones con los cuales se inocularon matraces con medio mínimo. Tras 24 h de incubación, el micelio de los distintos transformantes fue pasado a medio mínimo al que se adicionó treonina como inductor. La actividad AAO en los cultivos de

los distintos transformantes se siguió durante 72 h, utilizando como sustrato alcohol veratrílico. En la Fig. 38 se muestran los resultados del test de expresión, tomando como dato comparativo la actividad tras 48 h de incubación. Los transformantes Y78A y Y92F no presentaron cambios significativos en su actividad AAO respecto a la cepa de *E. nidulans* que incluía la forma salvaje del cDNA de la AAO (cuya actividad es del orden de 170 U/L). Para el transformante F501Y se detectaron niveles de actividad significativamente superiores, llegando a representar un 125 % respecto a la cepa nativa. Por el contrario, el transformante F501A presentó muy bajos niveles de actividad (del orden de 4 U/L). En el caso de las mutaciones Y92A, H546L, H546S, H502S, H502L y R403S, no se detectó actividad en ninguno de los transformantes analizados. Las únicas sustituciones activas para los residuos de histidina fueron H91S, H502R y H566R, las cuales presentaron bajos niveles de actividad (del orden de 6 y 2 U/L respectivamente), comparables a los obtenidos con la variante I401A (aproximadamente 4 U/L).

7.4. Purificación y caracterización de las variantes

A la vista de los resultados obtenidos en el test de expresión con los transformantes de *E. nidulans* que contenían las diferentes mutaciones del cDNA de la AAO, se planteó la purificación de aquellas variantes que presentaron alguna actividad frente al alcohol veratrílico. Otra serie de transformantes (con las mutaciones Y78F, H91S, Y92A, R403A, H502L, H502R, H502S, H546R y H546S) prácticamente no presentaron actividad AAO, revelando que los correspondientes residuos incluyendo tres histidinas (H91, H502 y H546), una arginina (R403) y dos tirosinas (Y78 y Y92) discutidos mas abajo son necesarios para la actividad catalítica. Hasta el momento de la escritura de este trabajo se han purificado y caracterizado las variantes que contienen las mutaciones F501Y, F501A, Y78A, Y92F y L315A. La purificación se llevó a cabo a partir de líquidos de cultivo de 48 h en medio de inducción con treonina. El proceso de purificación fue el mismo que se describió para la proteína salvaje. Tras la concentración de los líquidos de cultivo, se realizó un cromatografía de exclusión molecular seguida de otra de intercambio iónico, que permitieron la purificación a homogeneidad de las cinco proteínas mutadas con rendimientos similares a los obtenidos con la AAO* nativa.

Los espectros de absorción de la distintas variantes fueron similares a los descritos para la AAO* nativa incluyendo un máximo en torno a 463 nm, con el pequeño valle entorno a los 480 nm característico de una correcta unión del FAD a la proteína.

7.5. Propiedades catalíticas de las variantes obtenidas

Para estudiar la implicación de los residuos modificados en las propiedades catalíticas de las distintas variantes, se calcularon las constantes cinéticas de estado estacionario y se compararon con las obtenidos para la AAO* nativa. Los sustratos empleados fueron los alcoholes bencílico, *m*-anisílico, *p*-anisílico, veratrílico y cinamílico, y el 2,4-hexadien-1-ol. En la Tabla 26 se muestran los valores de la constante de afinidad (K_m), la constante catalítica (k_{cat}) y la eficiencia de oxidación (k_{cat}/K_m) para los distintos alcoholes. En general, todas las variantes presentaron cierta actividad frente a los diferentes sustratos ensayados. Las mayores diferencias se observaron en la k_{cat} , mientras que la afinidad por los sustratos ensayados se vio menos afectada, presentando la mayoría de las variantes valores de K_m similares o algo superiores a los de la AAO* nativa.

La variante F501Y no presentó diferencias significativas en las velocidades de oxidación de los distintos sustratos, obteniéndose valores de k_{cat} similares a los de la AAO* nativa. En cuanto a la afinidad tampoco se observaron diferencias significativas, salvo para los alcoholes *p*-anisílico y veratrílico, donde los valores de K_m fueron un 60% mas bajos que los de la AAO* nativa. Sin embargo, la sustitución de la F501 por un residuo no aromático, variante F501A, provocó una drástica disminución en las velocidades de oxidación, observándose una k_{cat} del orden de 3 s^{-1} para todos los sustratos ensayados. Esta variante también presentó una disminución en la afinidad, los valores de K_m frente a los alcoholes *m*-anisílico y bencílico y el 2,4-hexadien-1-ol fueron respectivamente 2, 4 y 5 veces mayores que los obtenidos con la AAO* nativa.

La AAO* con la mutación Y92F presentó propiedades catalíticas similares a las de la AAO* nativa, observándose las mayores diferencias en la oxidación del alcohol cinamílico. Con este alcohol los valores de K_m y k_{cat} fueron 6 veces mayores a los de la AAO* nativa, a pesar de presentar una eficiencia catalítica comparable. Hay que recordar que la variante Y92A resultó inactiva tal como se observó al analizar el correspondiente transformante (ver Fig. 38)

Tabla 26. Constantes cinéticas de las distintas variantes de la AAO*.

Alcohol		Nativa	Y78A	F501A	F501Y	Y92F	L315A
Bencílico	K_m	758 ± 110	929 ± 120	3293 ± 929	726 ± 83	1050 ± 75	807 ± 32
	k_{cat}	32 ± 6	28 ± 3	2 ± 0	29 ± 1	32 ± 6	18 ± 5
	k_{cat}/K_m	47 ± 9	39 ± 3	1 ± 0	44 ± 2	34 ± 1	22 ± 2
<i>m</i> -Anisílico	K_m	293 ± 138	359 ± 102	545	238 ± 54	298 ± 60	235 ± 13
	k_{cat}	18 ± 6	9 ± 1	1	17 ± 2	26 ± 1	13 ± 1
	k_{cat}/K_m	65 ± 24	28 ± 1	1	79 ± 4	85 ± 1	59 ± 2
<i>p</i> -Anisílico	K_m	28 ± 1	34 ± 2	26 ± 2	18 ± 1	45 ± 6	40 ± 1
	k_{cat}	149 ± 24	86 ± 3	3 ± 0	105 ± 5	150 ± 23	60 ± 0
	k_{cat}/K_m	5232 ± 1	2717 ± 0	102 ± 0	5630 ± 1	3490 ± 0	1498 ± 0
Veratrílico	K_m	592 ± 24	563 ± 7	348 ± 38	351 ± 22	610 ± 72	1012 ± 104
	k_{cat}	119 ± 5	89 ± 5	2 ± 0	89 ± 5	154 ± 34	88 ± 3
	k_{cat}/K_m	210 ± 5	61 ± 7	7 ± 1	271 ± 15	299 ± 48	89 ± 3
Cinamílico	K_m	748 ± 125	1356 ± 269	676 ± 26	n.d	4461 ± 1950	n.d
	k_{cat}	56 ± 10	183 ± 35	1 ± 0	n.d	343 ± 206	n.d
	k_{cat}/K_m	78 ± 11	160 ± 6	1 ± 0	n.d	102 ± 5	n.d
Hexadien-1-ol	K_m	92 ± 4	291 ± 153	439 ± 262	100 ± 0	116 ± 18	141 ± 3
	k_{cat}	144 ± 36	197 ± 64	2 ± 1	114 ± 4	208 ± 0	59 ± 11
	k_{cat}/K_m	1271 ± 55	995 ± 96	6 ± 2	1384 ± 86	1818 ± 18	445 ± 65

Se muestran las medias e intervalos de confianza del 95% para K_m (μM), k_{cat} (s^{-1}) y k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$), n.d: no determinado.

La variante Y78A presentó valores de K_m similares frente a todos los alcoholes ensayados. Sin embargo, se vieron afectadas las velocidades de oxidación, presentando valores de k_{cat} para todos los sustratos algo más bajos que los de la AAO* nativa. Por el contrario la variante Y78F presentó bajos niveles de actividad tal y como se muestra en la Fig. 38

La variante L315A presentó menor afinidad por los alcoholes *p*-anisílico y veratrílico y el 2,4-hexadien-1-ol que la AAO* nativa. Las velocidades de oxidación también fueron menores que las de la AAO* nativa para los sustratos ensayados, con la excepción de los alcoholes bencílico y *m*-anisílico.

Tabla 27. Eficiencia de las distintas variantes frente a la enzima nativa.

Alcohol	Nativa	Y78A	F501A	F501Y	Y92F	L315A
Bencílico	100	83	2	94	72	47
<i>m</i> -Anisílico	100	43	1.5	122	131	91
<i>p</i> -Anisílico	100	52	2	110	67	29
Veratrílico	100	29	3	129	142	42
Cinamílico	100	200	1	n.d	131	n.d
2,4 Hexadien-1-ol	100	78	0.1	110	141	35

n.d: no determinado

El efecto de las diferentes mutaciones se aprecia fácilmente en la Tabla 27 donde se compara la eficiencia catalítica de las distintas variantes para la oxidación de los seis alcoholes como un porcentaje de la eficiencia catalítica de la AAO* nativa. Las eficiencias más bajas para todos los sustratos se observaron con la variante F501A, que presentó valores 2 ordenes de magnitud por debajo de la AAO* nativa. Por el contrario, las variantes F501Y y Y92F presentaron para los alcoholes *m*-anisílico, *p*-anisílico, veratrílico y cinamílico y para el 2,4-hexadien-1-ol eficiencias mayores que los observadas con la AAO* nativa.

Finalmente hay que recordar que las histidinas H502 y H546 parecen indispensables para la actividad catalítica ya que ninguna de las variantes de las mismas presentó actividad (ver Fig. 38).

Discusión

La clonación previa del gen de la AAO de *P. eryngii* y su expresión heteróloga han permitido completar la caracterización físico-química, cinética y estructural de esta interesante oxidasa objeto del presente estudio. A lo largo de este capítulo se discutirán los resultados obtenidos a través de cuatro apartados. En el primero, se hablará de las propiedades físico-químicas y espectroscópicas de la AAO. En el siguiente se discutirán sus propiedades catalíticas, describiendo por primera vez las constantes cinéticas de la reacción de reducción de la enzima mediante técnicas de *stopped-flow*. A continuación, se incluye un apartado sobre los aspectos estructura-función más relevantes de la AAO. Éste aborda la comparación de su estructura primaria con otras oxidorreductasas, la descripción de la estructura molecular y el centro activo de la AAO, y la implicación de algunos residuos en la actividad catalítica. En el último apartado se propone un mecanismo de reacción para esta enzima.

1. Características de la AAO

Tras la clonación del gen y cDNA de la AAO de *P. eryngii* (Varela *et al.*, 1999) se han desarrollado en nuestro laboratorio dos sistemas de expresión heteróloga para esta oxidasa. Su expresión en el ascomiceto *E. nidulans* permitió obtener AAO* extracelular activa. Frente a los 15 días requeridos para obtener AAO salvaje de *P. eryngii*, en *E. nidulans* se consiguieron niveles 10-50 veces mayores en 48 h (Varela *et al.*, 2001). Por otro lado, la expresión heteróloga del cDNA de la AAO en *E. coli*, dio lugar a gran cantidad de proteína inactiva acumulada en cuerpos de inclusión. Sin embargo, mediante un proceso de plegado e incorporación del cofactor *in vitro* se pudo obtener AAO recombinante activa. Los niveles de producción fueron unas 40 veces mayores que los obtenidos en *E. nidulans* (25 mg de proteína activa pura por litro de cultivo de *E. coli* frente a 0,6 mg en *E. nidulans*) y el tiempo de cultivo fue también menor (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2004). Las formas recombinantes de AAO producidas en *E. nidulans* y *E. coli* presentaron propiedades catalíticas para los alcoholes ensayados similares a las de la enzima nativa, con una pequeña disminución en los valores de la k_{cat} . Los mismos sistemas de expresión heteróloga han sido utilizados en nuestro laboratorio para la obtención de VP de *P. eryngii* (Camarero *et al.*, 1999; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999b), aunque los resultados en este último caso pueden considerarse menos satisfactorios (Pérez-Boada *et al.*, 2002; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999a). Así, la expresión en *E. coli* permitió obtener unos 5.5 mg de VP*

pura y activa por litro de cultivo. Además, los niveles de VP* en *E. nidulans* (solo 0,5 mg/L) fueron incluso inferiores a la producción de VP salvaje por *P. eryngii* (2 mg/L). En consecuencia, no fue posible utilizar la expresión heteróloga eucariota para la caracterización de la VP al contrario de lo que se ha hecho con la AAO.

Respecto a sus propiedades físico-químicas, la AAO* producida en *E. nidulans* y *E. coli* mostraron las mayores diferencias en cuanto a su estabilidad (Ferreira *et al.*, 2002; Guillén *et al.*, 1992; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2004). La enzima recombinante producida en *E. nidulans* resultó ser estable en un amplio rango de pH (incluyendo valores ácidos) y a temperaturas por encima de los 50°C, donde la enzima de *E. coli* se inactiva. Esta mejor estabilidad se atribuyó a la ausencia de glicosilación en la AAO* de *E. coli*. La determinación de las masas moleculares, permitió deducir una pequeña diferencia en el grado de glicosilación de la AAO salvaje (10 %) y la recombinante de *E. nidulans* (11 %) sin diferencias en el tipo de glicosilación. La determinación precisa de la masa molecular de la AAO no glicosilada (mediante MALDI-TOF), permitió comprobar que esta oxidasa presenta una molécula de FAD por molécula de proteína (Ghisla y Massey, 1989).

Las flavoproteínas de tipo oxidasa presentan algunas características espectroscópicas comunes como la estabilización termodinámica de la flavina en forma de semiquinona aniónica (ver Fig. 5) y la formación de un aducto covalente entre el N5 de la flavina y el sulfito (Massey, 1995). Estas características sugieren la existencia de una carga positiva cercana a la zona N1-C2O de la flavina. Este hecho ha sido confirmado con la resolución de la estructura cristalográfica de algunas oxidasas (Hecht *et al.*, 1993; Lindqvist y Branden, 1989; Vrieling *et al.*, 1991). Estas han mostrado residuos con carga positiva orientados hacia la mencionada zona de la flavina, concretamente una lisina en la glicolato oxidasa, y distintas histidinas en la glucosa oxidasa y la colesterol oxidasa.

La reducción de las flavoproteínas por diferentes métodos puede dar información sobre sus características funcionales y estructurales. La flavina se puede reducir hasta su forma hidroquinona a través de dos reacciones de un electrón, observándose en ocasiones la forma parcialmente reducida como radical semiquinona (ver Fig. 5) (Massey y Hemmerich, 1980; Müller, 1987). La semiquinona puede presentar 2 formas distinguibles espectrofotométricamente: i) forma aniónica o roja con fuerte absorción alrededor de 380 nm y un máximo adicional a 400 nm; y ii) forma neutra o azul que absorbe en el rango de 580-610 nm. En las oxidasas es frecuente

que la formación de intermediarios de tipo semiquinona se observe durante la fotorreducción o reducción por ditionito pero no en la reducción por sus sustratos (Massey y Hemmerich, 1980; Müller, 1987).

Las características espectrofotométricas de la AAO fueron estudiadas por primera vez en ensayos de reducción con alcohol anisílico y ditionito, fotorreducción y reactividad con sulfito. La reducción anaeróbica de la AAO con alcohol *p*-anisílico reveló la existencia de sólo dos especies de la flavina, la forma oxidada de tipo quinona y la forma reducida de tipo hidroquinona. La posible estabilización del radical semiquinona de la AAO también fue investigada mediante fotorreducción (en presencia de 5-deazariboflavina) y reducción anaeróbica con ditionito. La reducción total de la AAO con ditionito dio una idea de su potencial redox que debe ser menor de -0.417 (Mayhew, 1978). En contra de lo esperado, ya que es característico de las oxidasas estabilizar la forma semiquinona aniónica, no se observó semiquinona en ninguno de los casos. Sin embargo, existen otras excepciones como la glucosa oxidasa, que por fotorreducción estabiliza la forma aniónica o neutra dependiendo del pH (Massey y Hemmerich, 1977). De igual manera, la vainillil-alcohol oxidasa forma semiquinona neutra, una característica de las flavoenzimas que no reaccionan o lo hacen pobremente con el O_2 (de Jong *et al.*, 1992).

Muchas oxidasas forman un aducto entre el N5 del anillo de flavina y el sulfito, dando espectros similares a los de sus formas reducidas (Massey *et al.*, 1969). La AAO no mostró reactividad con el sulfito incluso a altas concentraciones. También existen otras excepciones como la putrescina oxidasa (EC 1.4.3.10) (De Sa, 1972) o la vainillil-alcohol oxidasa (de Jong *et al.*, 1992). Con la resolución de la estructura cristalográfica de esta última se identificó un residuo ácido (D170) en las proximidades del N5, que por repulsión electrostática debe impedir la formación del aducto (Mattevi *et al.*, 1997a). En la AAO el residuo ácido más cercano al N5 (D312) se encuentra muy alejado (a 10 \AA). Además, cercano al C4a de la flavina de la AAO se encuentra H502 que en principio debería favorecer tanto la formación del aducto como la estabilización de la forma aniónica del radical semiquinona.

2. Actividad catalítica de la AAO

Estudios previos de especificidad de sustrato con la enzima salvaje de *P. eryngii* mostraron que la AAO cataliza la oxidación de alcoholes aromáticos

y alifáticos insaturados con un hidroxilo primario en el C α . El alcohol alílico (2-propen-1-ol) fue la estructura mínima oxidada aunque con muy baja actividad, incrementándose la tasa de oxidación de estos alcoholes a media que aumenta el número de dobles enlaces conjugados (Guillén *et al.*, 1992). La enzima presenta una amplia especificidad de sustrato, oxidando gran variedad de alcoholes bencílicos, cinámílicos, naftílicos y alifáticos poliinsaturados. Las constantes cinéticas calculadas para el alcohol bencílico y sus distintos derivados metoxilados (*p*-anisílico, *m*-anisílico, 2,4-dimetoxibencílico y veratrílico) mostraron que un grupo metoxilo en posición *para* ejerce un efecto positivo sobre la afinidad y velocidad de oxidación de los sustratos y que por el contrario en posición *meta* afecta negativamente a la velocidad de oxidación. La oxidación catalizada por la AAO está determinada no sólo por la posición de los sustituyentes en el anillo de benceno, sino también por su naturaleza. Mientras que la actividad sobre el alcohol *p*-anisílico es del 571 % respecto al alcohol bencílico, la del alcohol *p*-nitrobencílico es tan sólo del 9%.

2.1. Cinética de estado estacionario

En este trabajo se ha investigado el efecto de distintos sustituyentes (flor, cloro y metoxilo) en posiciones *para* y *orto* del alcohol bencílico. Las constantes cinéticas obtenidas no mostraron una clara relación entre la tasa de oxidación de los distintos derivados bencílicos por la AAO y el carácter electrónico de los sustituyentes (Ferreira *et al.*, 2002). Así, en posición *para* el fuerte carácter electronegativo de los halógenos no parece tener un efecto desactivante del anillo de benceno pues las k_{cat} de los alcoholes *p*-fluorobencílico y *p*-clorobencílico fueron iguales o superiores a las observadas para el alcohol bencílico. En el caso de las sustituciones en *meta* las velocidades de oxidación de los alcoholes *m*-anisílico y *m*-clorobencílico fueron similares a pesar de tratarse de dos sustituyentes con un efecto electrónico contrario. En los estudios realizados con la monoamino oxidasa (EC 1.4.3.4) tampoco se detectó un claro efecto electrónico para la oxidación de bencilamina con distintos sustituyentes en posición *para*, atribuyéndose estos resultados a que la unión y orientación del sustrato en el centro activo es más importante que el efecto electrónico (Edmondson, 1995; Hartmann y Klinman, 1991; Nandigama y Edmondson, 2000; Walker y Edmondson, 1994).

En cuanto al efecto de los sustituyentes en la afinidad de la AAO, la presencia de fluor en posiciones *meta* y *para* apenas provocó variaciones significativas en los valores de K_m . Sin embargo, al aumentar el volumen de los sustituyentes (de cloro a metoxilo) la afinidad aumentó. El ácido 4-hidroximetilbenzoico (la AAO oxida el grupo hidroximetilo) fue el peor sustrato ensayado, con una afinidad mas de 25 veces inferior a la del alcohol bencílico. El grupo carboxilo en esta posición debe afectar negativamente a la afinidad. Este compuesto presenta una tasa de oxidación (2% respecto al alcohol bencílico) comparable a las obtenidas con los alcoholes *p*-hidroxibencílico y *p*-nitrobencílico (Guillén *et al.*, 1992). Por el contrario, la AAO mostró la mayor afinidad por el alcohol 3-cloro-*p*-anisílico (K_m 17 μ M), de acuerdo con los resultados preliminares obtenidos por de Jong *et al.* (1994) con la AAO de *Bjerkandera*.

El calculo de las constantes cinéticas para el 2,4-hexadien-1-ol corroboró la alta actividad de la AAO sobre este alcohol alifático descrita por Guillén (1992). La AAO de *P. eryngii* presentó una alta eficiencia oxidando este compuesto, lo que la diferencia de otras AAO fúngicas incapaces de oxidar alcoholes alifáticos insaturados (Farmer *et al.*, 1960; Muheim *et al.*, 1990) y la relaciona con la AAO de algunas especies de gasterópodos que presenta actividad frente al 2-buten-1-ol (Large y Connock, 1993).

Los estudios realizados mostraron que la AAO de *P. eryngii* es específica para la oxidación de alcoholes y aldehídos, siendo incapaz de catalizar reacciones de desmetilación, hidratación y desaminación. Estas reacciones son típicas de otras oxidasas de alcoholes aromáticos como la vainillil-alcohol oxidasa (Fraaije *et al.*, 1995). Esta última flavoenzima oxida alcoholes aromáticos fenólicos (activados) mientras que la AAO presenta actividad frente alcoholes aromáticos no fenólicos, hecho que hace suponer distintos mecanismos de oxidación. Sin embargo, ambas oxidasas reconocen compuestos de estructuras similares llegando los sustratos de una a ser inhibidores de la otra, como en el caso del alcohol cinamílico (sustrato de la AAO e inhibidor de la vainillil-alcohol oxidasa) y el chavicol (sustrato de la vainillil-alcohol oxidasa e inhibidor de la AAO) (de Jong *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2002).

Los estudios de inhibición realizados pusieron de manifiesto que la AAO reconoce compuestos con sistemas de dobles enlaces conjugados con independencia de que contengan o no grupos hidroxilos alcohólicos. Este es el caso del tolueno o el ácido *p*-anísico inhibidores competitivos de la AAO de *P. eryngii* con una K_i similar o incluso mas baja que la K_m para el alcohol

bencílico. En la bibliografía existen otras oxidasa, como la monoamino oxidasa, que presentan afinidades más altas por algunos de sus inhibidores competitivos que por sus sustratos (Dostert y Strolin, 1991). Este hecho esta relacionado con el concepto de K_m , ya que ésta no es una simple K_d que refleje la formación del complejo enzima sustrato. El hecho de que el ácido *p*-anísico muestre una K_i ligeramente superior a la K_m del alcohol *p*-anisílico pero comparable a la K_m del alcohol *p*-clorobencílico indica que compuestos de tipo bencenocarboxílico pueden unirse a la AAO a pesar de la baja actividad sobre el ácido 4-hidroximetilbenzoico mencionada anteriormente. Finalmente, el tipo de inhibición (acompetitiva) ejercida por la *p*-metoxibencilamina (K_i 0.250 mM), hace suponer que la unión se efectúa en un sitio distinto al centro activo al que se fijan los sustratos.

En los estudios de especificidad de sustrato realizados por Guillén *et al.* (1992) se describió una baja actividad de la AAO de *P. eryngii* sobre aldehídos aromáticos. Los estudios de ^{19}F NMR realizados en este trabajo utilizando *p*-fluorobenzaldehído como sustrato permitieron identificar el ácido *p*-fluorobenzoico como producto de la actividad aldehído oxidasa de la AAO. La actividad sobre el *p*-fluorobenzaldehído supuso en torno a un 4% respecto a la actividad sobre el alcohol *p*-fluorobencílico, y fue similar a la del *p*-nitrobenzaldehído. Mediante la técnica de *stopped-flow*, cuyos resultados más relevantes se discuten en el apartado siguiente, fue posible mostrar la lenta reducción del FAD de la AAO por el *p*-anisaldehído. Esta actividad dual de una alcohol oxidasa sobre alcoholes y aldehídos ha sido mencionada para la metanol oxidasa (Hopkins, 1985) pero no se ha investigado en detalle. A su vez, Large y Connock (1993) han descrito en las glándulas digestivas de gasterópodos la actividad conjunta de dos enzimas, aldehído y alcohol oxidasa, capaces de oxidar alcoholes aromáticos a sus correspondientes ácidos. Ninguna de ellas ha sido purificada hasta el momento. Finalmente hay que mencionar que en *Streptomyces viridosporus* ha sido también descrita una aldehído oxidasa capaz de actuar sobre aldehídos aromáticos (Deobald y Crawford, 1989).

2.2. Estudios de cinética rápida

El ciclo catalítico de la AAO es iniciado con la reducción del FAD en la oxidación de alcoholes (reacción de reducción) y completado con la oxidación del FAD reducido por el O_2 (reacción de oxidación) y la consecuente producción de H_2O_2 . En la reacción de reducción, los alcoholes

aromáticos o alifáticos poliinsaturados son oxidados a sus respectivos aldehídos, los cuales por los resultados mostrados en este trabajo pueden ser a su vez oxidados por la AAO a los correspondientes ácidos.

Utilizando la técnica de *stopped-flow* se analizó la reacción de reducción de la AAO por cuatro sustratos, los alcoholes *p*-anisílico, 3-cloro-*p*-anisílico y veratrílico, y el *p*-anisaldehído. Para discutir las cinéticas de estas reacciones, es necesario tener en cuenta el número de formas espectrofotométricamente distinguibles de la AAO. En los estudios de reducción con diferentes compuestos (ver apartado 1.2) tan sólo se observaron la forma oxidada y reducida, y ensayos utilizando *stopped-flow* tampoco mostraron cambios de absorbancia entorno a los 500 nm, característicos de las formas semiquinona. Por todo ello, la discusión presentada en este apartado se basa en la existencia de sólo dos formas diferentes en la catálisis de la AAO, que corresponden a la forma oxidada y reducida del cofactor.

El análisis global de las reacciones de oxidación de los alcoholes estudiados reveló la existencia de una fase inicial de formación o adaptación del complejo enzima-sustrato (sin cambios aparentes de absorbancia del FAD a 460 nm), tras la cual tendría lugar la transferencia de electrones y oxidación del sustrato. Esta fase pudo ser claramente distinguible con los sustratos de menor afinidad, como el alcohol veratrílico y el *p*-anisaldehído, donde este proceso se ve ralentizado. Esta primera fase ha sido también observada en la oxidación de la D-alanina por la D-aminoácido oxidasa (Pollegioni *et al.*, 1994). Por otro lado, para todos los alcoholes ensayados se observó una fase de reducción rápida de la flavina por el alcohol seguida de una fase de reducción lenta (de pequeña amplitud y dependiente de altas concentraciones de sustrato), atribuida a la interacción y/o oxidación del aldehído producido por la AAO. Al utilizar *p*-anisaldehído como sustrato se observó una lenta reducción de la AAO, corroborando dicha hipótesis. La reducción por este aldehído fue de similar amplitud a la reacción global observada para los alcoholes con los que se utilizó igual concentración de enzima. Sin embargo, fue un orden de magnitud más lenta que la reacción atribuida a la oxidación de los aldehídos formados enzimáticamente. Esta diferencia puede deberse a la mayor accesibilidad de estos últimos, ya que se generan en el entorno de la proteína y la formación del complejo enzima-sustrato debe verse facilitada. Estos datos son novedosos ya que hasta ahora no se había probado la actividad aldehído oxidasa de la AAO frente a los aldehídos generados por la propia enzima.

Los ensayos con distintas concentraciones de los alcoholes *p*-anisílico y 3-cloro-*p*-anisílico permitieron un estudio cinético detallado con estos sustratos, que reveló dos cinéticas distintas de reducción de la AAO. Esto ya ha sido observado con otras oxidasas, como la glucosa oxidasa donde las cinéticas de oxidación de la glucosa y otros azúcares son distintas, aunque esto no implique un mecanismo de reacción diferente (Gibson *et al.*, 1964). También existen casos extremos, como el de las monoamino oxidasas para las que Husain *et al.* (1982) sugirieron dos mecanismos catalíticos distintos (vía formación de un complejo binario o ternario) en función de que el compuesto a oxidar fuese fenetilamina o bencilamina.

La reacción de reducción de la AAO por el alcohol *p*-anisílico obedeció a un proceso de formación de complejo enzima-sustrato, con posterior transferencia electrónica a la flavina y formación irreversible de un producto oxidado. El valor de la constante de disociación para dicho complejo (k_{-1}/k_1) fue aproximadamente 34 μM , en concordancia al valor de K_m obtenido en estado estacionario (37 μM). La constante de reducción (k_2) por el alcohol anisílico fue de alrededor de 300 s^{-1} , un valor superior al de la k_{cat} (134 s^{-1}), lo que hace pensar que este paso no es el limitante en la oxidación del alcohol *p*-anisílico por la AAO. La reacción de reducción de la glucosa oxidasa por 2-desoxi-D-glucosa obedece al mismo tipo de cinética observada en la reducción de la AAO por el alcohol *p*-anisílico (Gibson *et al.*, 1964).

La reacción de reducción de la AAO por el alcohol 3-cloro-*p*-anisílico fue más compleja y obedeció a un proceso bifásico, donde se observó una primera reacción de menor amplitud y linealmente dependiente de la concentración de sustrato sin llegar a alcanzar la saturación. El segundo proceso resultó ser mucho mas lento e independiente de la concentración de sustrato. Un primer análisis, mediante las ecuaciones descritas por Strickland *et al.* (1975), permitió el calculo de una k_1 de 1,8 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Asumiendo que la k_d sea del orden de la K_m (17 μM), la constante de reducción sería 30 s^{-1} , un valor que se encuentra en el mismo rango que la k_{cat} (60 s^{-1}). Pero esta interpretación excluye la segunda reacción observada, que fue incluso de mayor amplitud que la primera. Una segunda interpretación permitió incluir las dos fases de la reacción, abordando el proceso de una manera global. Así, el primer paso representaría un proceso reversible de reducción de la AAO con valores de k_{-1} y k_1 de 53 s^{-1} y 125 s^{-1} respectivamente, encontrándose la mayor parte de la flavina en su forma oxidada (de ahí la pequeña amplitud de la reacción observada para esta

primera fase). La segunda fase reflejaría el decaimiento del complejo entre la enzima reducida y el producto o un intermediario en la reacción ($E_{red}-I$). Un proceso bifásico similar ha sido descrito para otras oxidasas como vainillil alcohol oxidasa, D-aminoácido oxidasa y lactato oxidasa (EC 1.13.12.4) (Fitzpatrick y Massey, 1982; Fraaije y van Berkel, 1997; Lockridge *et al.*, 1972; Pollegioni *et al.*, 1993; 1997). Para todas ellas la formación del complejo $E_{red}-I$ da una banda de absorbancia entorno a los 500 nm. La reducción de la AAO con el alcohol 3-cloro-*p*-anisílico utilizando *stopped-flow* se realizaron a 460 nm, por lo que se requieren posteriores análisis a otras longitudes de onda para confirmar los resultados obtenidos. De cualquier forma, la formación de compuestos intermediarios por la AAO había sido ya sugerida en los estudios de ^{19}F NMR con alcohol *m*-fluorobencílico, que incluye un sustituyente de similares propiedades electrónicas en el anillo bencénico. Finalmente, y tal como se ha descrito para el alcohol *p*-anisílico, se observó una fase de reducción lenta que se corresponde a la oxidación del 3-cloro-*p*-anisaldehído.

3. Estudios estructura-función de la AAO

La clonación del gen de la AAO y la obtención de un modelo molecular teórico utilizando como referencia la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa (Varela *et al.*, 2000b) nos permitió realizar los estudios estructura-función descritos en el presente trabajo. Un estudio detallado de la secuencia primaria de la AAO ha llevado a relacionarla con la familia GMC de oxidorreductasas. Los espectros de dicroísmo circular de la AAO corroboraron el predominio de hélices- α en su estructura secundaria. A partir de los estudios de *docking* con distintos alcoholes, se obtuvo la información necesaria para localizar el centro activo. Finalmente, los estudios de mutagénesis dirigida aportaron interesante información acerca algunos de los aminoácidos implicados en la oxidación de los sustratos y su posible mecanismo de acción.

3.1. Un nuevo miembro de las oxidorreductasas GMC

En 1992 Caverer definió una nueva familia de flavoproteínas, las GMC oxidorreductasas, que agrupaba a enzimas con una gran similitud en su estructura primaria (Cavener, 1992). Esta familia estuvo inicialmente

compuesta por la glucosa deshidrogenasa y oxidasa, metanol oxidasa y colina deshidrogenasa. Todas ellas se caracterizan por contener en su extremo amino terminal una secuencia de unos 30 aminoácidos que se corresponde con el dominio $\beta\alpha\beta$ de unión del ADP descrito por Wierenga (1983). Posteriormente, fueron incluidas la colesterol oxidasa de *Brevibacterium sterolicum* y *Streptomyces* sp (Li *et al.*, 1993; Yue *et al.*, 1999), alcohol deshidrogenasa de *Pseudomonas oleovorans* (van Beilen *et al.*, 1992) y, más recientemente, piranosa oxidasa (EC.1.1.3.10) de *T. versicolor* y *T. hirsuta* (Albrecht y Lengauer, 2003). También se ha relacionado con esta familia a la celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium* (dominio flavo) (Li *et al.*, 1996) y a la hidroxinitrilo liasa de almendra (Dreveny *et al.*, 2001) (Fig. 39). Todas estas proteínas presentan secuencias conservadas en distintas regiones, sobre todo a nivel del dominio de unión del FAD, incluyendo *Signature 1 PS000623* y *Signature 2 PS000624*. Actualmente existen en la base de datos EMBL-EBI 188 proteínas que contiene alguna de las dos secuencias consenso que caracterizan a esta familia.

La comparación de la estructura primaria de la AAO de *P. eryngii* con la glucosa oxidasa (*A. niger* y *P. amagasakiense*) y hidroxinitrilo liasa (*P. amygdalus*) reveló la existencia de numerosos residuos conservados, la mayoría de los cuales se localizan en las proximidades del cofactor. Estos residuos incluyen 4 secuencias consenso típicas de la familia GMC, entre ellas las dos mencionadas anteriormente. La AAO presenta 2 residuos no conservados en la secuencia consenso *Signature 1 PS000623*. Se trata de: i) un residuo de asparagina altamente conservado en todos los miembros de la familia GMC (N107 en la glucosa oxidasa) implicado en la unión del cofactor al O2 de la parte ribitol, que en la AAO está sustituido por una histidina (H91); y ii) la M93 de la AAO en lugar de la fenilalanina, triptofano o alanina de la secuencia consenso. Existen otras excepciones, como la colesterol oxidasa que no incluye los 5 últimos residuos de *Signature 2 PS000624*, aunque su estructura presenta la topología típica de esta familia (Li *et al.*, 1993).

Figura 39 (pagina siguiente). Arquitectura molecular de la glucosa oxidasa (1GAL) (Hecht *et al.*, 1993; Wohlfahrt *et al.*, 1999), colesterol oxidasa (1COY) (Vrielink *et al.*, 1991; Yue *et al.*, 1999), celobiosa deshidrogenasa (1NAA) (Hallberg *et al.*, 2002) e hidroxinitrilo liasa (1JU2) (Dreveny *et al.*, 2001). Los modelos cristalográficos muestran la estructura secundaria y el plegamiento general de estas oxidorreductasas de la familia GMC, incluyendo los dominios superior (unión del sustrato) e inferior (unión del FAD) y el cofactor en la posición central.

1GAL



1COY



1NAA



1JU2



En general, los elementos estructurales de la glucosa oxidasa y otros miembros de la familia GMC (Kiess *et al.*, 1998) están también presentes en el modelo teórico (1QJN) (Varela *et al.*, 2000b) de la AAO de *P. eryngii* descrito en el apartado 6.3 de resultados. La arquitectura molecular general de la AAO y otros miembros de la familia GMC consiste en dominios estructurales: uno de unión del sustrato y otro de unión del FAD (Kiess *et al.*, 1998; Varela *et al.*, 2000b). El primero está formado en todos los casos por dos láminas β rodeadas por un número variable de hélices- α . En él se encuentra el motivo $\beta\alpha\beta$ de unión del FAD y también las zonas amino y carbono terminal. La hélice H1 es parte de este motivo y estabiliza con su efecto dipolo la carga negativa del grupo pirofosfato. El dominio de unión del sustrato tiene en todas ellas una distribución parecida de las hélices- α .

Las similares características estructurales de AAO, colesterol oxidasa y glucosa oxidasa, así como las identidades de secuencia, llevan a pensar que la AAO de *P. eryngii*, al igual que la hidroxinitrilo liasa de almendra y el dominio flavo de la celobiosa deshidrogenasa mencionadas anteriormente, deben ser incluidas como nuevos miembros de la familia GMC de oxidorreductasas (ver Fig. 39).

3.2. Dominio de unión del FAD

La región de unión del FAD es la zona mejor conservada, incluyendo numerosos aminoácidos conservados entre la AAO y otros miembros de la familia GMC de oxidorreductasas. Las interacciones con la molécula de FAD son principalmente mediante puentes de hidrógeno entre la ribosa y el pirofosfato del cofactor y residuos próximos al mismo. En el modelo teórico de la AAO se identifican 17 puentes de hidrógeno, pudiendo existir alguno más a través de moléculas de agua. Para la glucosa oxidasa están descritos 23 puentes de hidrógeno, de los cuales 7 son a través de moléculas de agua (Hecht *et al.*, 1993). De ellos tan sólo se encuentra conservado en la AAO el puente de hidrógeno entre la cadena lateral de E33 (E55 en glucosa oxidasa) con el O2' de la ribosa del FAD. Este residuo forma parte del motivo $\beta\alpha\beta$ de unión del FAD y está altamente conservado en todos los miembros de la familia GMC. En esta zona la AAO presenta en su superficie un residuo de asparagina (R20), conservado en otros miembros de la familia GMC (R42 en la glucosa oxidasa), que sirve de unión entre las hélices H1 y H11 a través de contactos hidrofóbicos. La AAO también presenta en su extremo C- terminal la hélice H13 (H13 y H9 en glucosa

oxidasa y hidroxinitrilo liasa respectivamente), estructuralmente conservada en esta familia y que establece contactos con el O₂ del anillo de la flavina, estabilizando la polarización negativa de éste mediante su efecto dipolo (Dreveny *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 1993; Wierenga *et al.*, 1983).

3.3. Descripción del centro activo

Si bien es cierto que las flavoproteínas que componen la familia GMC se encuentran desde un punto de vista evolutivo y estructural relacionadas, catalizan sin embargo reacciones bioquímicas diferentes (en las que el FAD está implicado en la transferencia electrónica). Es por ello, que el dominio de unión del sustrato es la región mas heterogénea, presentando una escasa identidad de secuencia aunque está estructuralmente conservado. A pesar de ello, la superposición del centro activo de la glucosa oxidasa, la colesterol oxidasa y la hidroxinitrilo liasa con la correspondiente región de la AAO reveló características comunes en todas ellas (Dreveny *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 1993; Wohlfahrt *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 1999).

3.3.1 Sitio de unión de los sustratos

En la AAO se observa un canal de acceso al interior de la proteína, que finaliza en una depresión donde se encuentra el FAD (ver Fig. 35). En posiciones similares de la colesterol oxidasa, glucosa oxidasa y hidroxinitrilo liasa existe un canal que conecta el centro catalítico de estas proteínas con la superficie. La cavidad de la AAO es más abierta si se compara con la observada en el modelo cristalográfico de la colesterol oxidasa y hidroxinitrilo liasa y de características más similares a la de la glucosa oxidasa. En las dos primeras oxidasas, bloqueando la entrada al canal se encuentra un lazo de uno 40 residuos. La estructura cristalográfica del complejo de la colesterol oxidasa con D-hidroisoandrosterona, permitió establecer que este lazo es flexible y actúa a modo de tapadera que se abre y cierra permitiendo la entrada de los sustratos (Li *et al.*, 1993). En la AAO también existe de un lazo en esta zona, semejante al descrito para la glucosa oxidasa (Li *et al.*, 1993). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la glucosa oxidasa es una proteína dimérica, situándose los residuos del lazo en la interfase del dímero, mientras que la AAO (al igual que la colesterol oxidasa y la hidroxinitrilo liasa) es un monómero.

El *docking* con diferentes sustratos de mostró que la mayoría de las moléculas se sitúan en el interior de una cavidad localizada en las proximidades de la flavina de la AAO. Los alcoholes aparecen enfrentados al anillo de flavina en su cara *re*. Esta orientación es parecida a la descrita en la estructura cristalográfica del complejo colesterol oxidasa/D-hidroisoandrosterona (Li *et al.*, 1993) y en el modelo glucosa oxidasa/D-glucosa (Hecht *et al.*, 1993; Wohlfahrt *et al.*, 1999).

Rodeando a los alcoholes y definiendo el bolsillo de unión de sustratos de la AAO se encuentran los residuos: Y78, Y92, L315, I401, R403, T413, A415, N498, I500, F501, H502 y H546. La naturaleza de este bolsillo es fundamentalmente hidrofóbica, al igual que ocurre en otras oxidasas como la D-amino oxidasa (Mattevi *et al.*, 1996), la glicolato oxidasa (Müller, 1991) o incluso la glucosa oxidasa. En esta última la unión de la D-glucosa está estabilizada por contactos hidrofóbicos con residuos de fenilalanina, triptófano y tirosina (F414, W426 y Y68 para la glucosa oxidasa de *P. amagasakiense*) (Wohlfahrt *et al.*, 1999). El carácter hidrofóbico del bolsillo de la AAO no es de extrañar dado su especificidad por los alcoholes aromáticos y alifáticos con sistemas de dobles enlaces conjugados.

3.3.2 Papel de los residuos H502 y H546 como bases

La situación de los residuos H502 y H546, a distancias menores de 4 Å del anillo de flavina, hace pensar en su posible función como bases activas en el mecanismo redox de la AAO. H502 se encuentra conservada en todos los miembros de la familia GMC (H516, H520, H447 y His459 en glucosa oxidasa de *A. niger* y *P. amagasakiense*, colesterol oxidasa e hidroxinitrilo liasa respectivamente). Este residuo ocupa la misma posición en estas proteínas, situándose por encima del anillo de isoaloxazina, muy próximo al C4a (Dreveny *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 1993; Wohlfahrt *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 1999). Por el contrario, H546 de la AAO, tan sólo se encuentra conservado en algunos miembros de la familia GMC, como la glucosa oxidasa (H559 y H563 de *A. niger* y *P. amagasakiense* respectivamente) y la hidroxinitrilo liasa (H497). En la glucosa oxidasa H559 se encuentra formando por su N^{ε2} un puente de hidrógeno con el O^{ε1} de E412. En otros miembros de la familia GMC (como la metanol oxidasa, la colesterol oxidasa y el dominio flavo de la celobiosa deshidrogenasa) esta segunda histidina está reemplazada por una asparagina (Cavener, 1992; Hallberg *et al.*, 2002; Rotsaert *et al.*, 2003; Su y Klinman, 1999).

En la colesterol oxidasa esta asparagina (N485) también forma un puente de hidrógeno con un residuo de glutamato (E361) (Li *et al.*, 1993). Experimentos de mutagénesis dirigida de los residuos E361 y His447 demostraron que este glutamato no sólo actúa como una base en la reacción de isomerización sino que también participa en la oxidación del sustrato (la colesterol oxidasa cataliza la oxidación y isomerización del colesterol). Estos resultados sugieren que en la colesterol oxidasa es necesaria la participación como bases de los residuos E361, H447 y N385 mediada por el sistema de puentes de hidrógeno establecido con la molécula H_2O^{541} (Kass y Sampson, 1998; Yue *et al.*, 1999). En la AAO este glutamato no se encuentra conservado y sobre el modelo teórico, la H546 forma a través de su N^{62} un puente de hidrogeno con un residuo de asparagina (N333) bastante alejado del glutamato conservado tras alineamiento con la colesterol oxidasa. Estudios de mutagénesis dirigida de los correspondientes residuos en la celobiosa deshidrogenasa (H689 y R732) han confirmado su papel como bases activas y mostrado que R732 está también implicada en la unión de sustratos (Rotsaert *et al.*, 2003).

Con la glucosa oxidasa de *P. amagasakiense* se ha realizado también mutagénesis dirigida de algunos de los residuos que forman parte de su centro activo (Witt *et al.*, 2000). Así se observó que la sustitución de H563 (H546 en la AAO) por alanina o valina provoca la total inactivación de la enzima, mientras que las mismas sustituciones en H520 (H502 en la AAO) provocaron un descenso de 4 y 5 ordenes de magnitud en las V_{max} para la oxidación de la D-glucosa, sin cambio en la afinidad. Estos resultados sugieren un papel de estas histidinas como bases activas en el mecanismo de oxidación de la glucosa (y como ácidos en la reducción del O_2), previamente propuesto en base a su estructura cristalográfica (Hecht *et al.*, 1993; Su y Klinman, 1999; Wohlfahrt *et al.*, 1999).

En el modelo teórico de la AAO la H502 se localiza a distancias menores de 4 Å del N1 de la flavina. Esta situación es bastante favorable para estabilizar con su forma protonada la carga negativa de la flavina reducida. La posible implicación de H502 y H546 en el mecanismo de acción de AAO fue también evaluada por mutagénesis dirigida. Las sustitución de H502 y H546 por serinas y leucinas provocó la inactivación total de las variantes de la AAO, y la sustitución por arginina afectó notablemente a la actividad, detectándose solo un 1,5 % respecto a la enzima nativa. De esta forma quedó demostrada la participación activa de los residuos H502 y H546 en la actividad catalítica de la AAO. Es posible

concluir que en AAO y glucosa oxidasa los dos residuos de histidina podrían actuar como bases en la reacción de reducción de la enzima.

3.3.3 Papel de los residuos aromáticos

En el modelo teórico de la AAO descrito por Varela *et al.* (2000b) el 85% de los residuos de fenilalanina están situados en el dominio de unión de los sustratos. Situaciones parecidas han sido observadas en otras flavoenzimas, como la poliamino oxidasa que presenta un túnel de acceso de unos 30 Å de naturaleza fundamentalmente hidrofóbica (Binda *et al.*, 1999). La vainillil-alcohol oxidasa presenta en su centro activo cuatro residuos aromáticos, tres residuos de tirosina (Y108, Y187 e Y503) y un residuo de fenilalanina (F524) (Mattevi *et al.*, 1997a). Esta oxidasa no está muy relacionada estructuralmente con la AAO, pero si lo está desde un punto de vista catalítico, pues también oxida alcoholes aromáticos. Al igual que en la vainillil-alcohol oxidasa, también en la AAO se observan tres residuos aromáticos (Y78, Y92 y F501) próximos al FAD que podrían estar implicados en la oxidación de los sustratos (Varela *et al.*, 2000b).

El residuo F501 se encuentra en la parte inferior del bolsillo de unión de sustratos, muy cercano al FAD y a H502. En el alineamiento descrito por Caverneer (1992) todas las oxidorreductasas de la familia GMC (con la excepción de la glucosa deshidrogenasa) muestran en esta posición un residuo aromático, que parece establecer contactos hidrofóbicos en el centro activo. La implicación de este residuo en la actividad catalítica de la AAO fue evaluada por mutagénesis dirigida. La sustitución por otro residuo aromático, originó una variante (F501Y) con propiedades catalíticas muy similares a las de la enzima nativa. Sin embargo, su sustitución por otro residuo hidrofóbico de naturaleza no aromática (variante F501A) provocó una drástica disminución de la k_{cat} para todos los sustratos ensayados (1-3 s⁻¹ frente a 18-144 s⁻¹ en la enzima nativa), sin apenas afectar a la afinidad (excepto para el alcohol veratrílico). Estos resultados mostraron la necesidad de un residuo aromático en esta posición próxima a la flavina de la AAO. También sugirieron que este residuo aromático está implicado en interacciones hidrofóbicas en el centro activo que modulan el potencial redox de esta proteína.

El otro residuo aromático que participa en el centro activo es Y92, situado en la parte superior del bolsillo de la AAO formando un puente de hidrógeno con R403. Este residuo pertenece a una de las secuencias

consenso de la familia GMC (*Signature 1 PS000623*), siendo la alcohol oxidasa (metanol oxidasa) y la AAO las únicas que poseen un residuo aromático en esta posición (el resto presentan residuos de glicina y alanina). En el caso de la metanol oxidasa el residuo de fenilalanina provoca una disminución en el espacio del centro activo (Kiess *et al.*, 1998). En la AAO Y92 se sitúa en dirección al centro activo, en una orientación bastante favorable para estar implicado en la unión de los sustratos. Es curioso mencionar que una superposición de los centros activos de la AAO y la glucosa oxidasa revela la existencia en esta última de un residuo de tirosina (Y68 en la glucosa oxidasa de *A. niger*) situado en la misma posición que la Y92 de la AAO. En el modelo glucosa oxidasa/D-glucosa, este residuo establece un puente de hidrógeno con la 4-OH del azúcar (Wohlfahrt *et al.*, 1999). Su sustitución por un residuo de fenilalanina, eliminaría el citado puente de hidrógeno, manteniendo los contactos hidrofóbicos. La variante no mostró cambios en sus constantes catalíticas lo que indicaría que este residuo no tiene un papel importante en la unión de los sustratos a la glucosa oxidasa (Witt *et al.*, 2000).

En la AAO se realizó mutagénesis dirigidas Y92 sustituyéndolo por alanina o fenilalanina. Ambas mutaciones provocan la pérdida del puente de hidrógeno entre la Y92 y R403. Sin embargo, éste no debe ser fundamental para la arquitectura del bolsillo dados los resultados obtenidos con la variante Y92F. Ésta mostró incluso un incremento en la afinidad por algunos de los alcoholes ensayados (*m*-anisílico, veratrílico, cinamílico y 2,4 hexadien-1-ol). Este residuo podría ayudar a los sustratos a posicionarse con una adecuada orientación, incluyendo la formación de un puente de hidrógeno con el OH de la tirosina. La variante Y92A de la AAO resultó inactiva y supuso de igual manera la pérdida de este ambiente hidrofóbico. Por lo tanto la Y92 de la AAO debe jugar un papel importante estabilizando el centro activo mediante interacciones hidrofóbicas. Cabe mencionar que en los estudios de mutagénesis dirigida de la glucosa oxidasa realizados por Wit *et al.* (2000) también se sustituyó este residuo de tirosina por una glutamina pero la variante perdió su estructura.

3.3.4 Otros residuos del bolsillo de unión de sustratos

Los resultados del *docking* de la AAO con diferentes sustratos sugirieron la posible implicación de los residuos I401, R403 y L315 en la oxidación de los sustratos dada su posición en el centro activo.

I401 de la AAO se corresponde en el alineamiento con la glucosa oxidasa de *A. niger* con E412, residuo con un probado papel estructural y funcional en miembros de la familia GMC (Kiess *et al.*, 1998). Su sustitución por una alanina provocó una reducción (sobre 40%) de la actividad de la AAO frente al alcohol veratrílico. Próximo al anterior residuo de isoleucina se encuentra R403. Su sustitución por una serina provocó la total inactivación de la enzima. Este residuo se corresponde en la glucosa oxidasa con un residuo de fenilalanina (F414 y F418 de *A. niger* y *P. amagasakiense* respectivamente) implicado en contactos hidrofóbicos en el centro activo (Witt *et al.*, 2000). Estos residuos ocupan posiciones y orientaciones similares en los centros activos de la glucosa oxidasa y la AAO, lo que sugiere que R403 de la AAO podría estar implicado en la unión a los sustratos. Una mejor caracterización futura podrá darnos más información a cerca de su función.

El residuo L315 queda orientado y muy próximo a los sustratos tras los cálculos de *docking* con la AAO. Por mutagénesis dirigida se introdujo un residuo de alanina en su lugar. El cambio origina un espacio mas abierto en el bolsillo de unión de los sustratos, alejando dicho residuo del sustrato. Las propiedades catalíticas de la variante L315A fueron dependientes del tipo de sustrato y, en el caso de los derivados del alcohol bencílico, de la posición en la que se encuentra el grupo metoxilo. No se observaron cambios significativos en la eficiencia de oxidación del alcohol *m*-anisílico (a pesar de no ser un buen sustrato de la AAO). Sin embargo, se observaron similares valores en la eficiencia catalítica para los alcoholes bencílico, *p*-anisílico y veratrílico con una eficiencia del 30% respecto a la enzima nativa. Es por ello que proponemos que el residuo L315 de la AAO participa en la adecuada orientación y unión de los sustratos.

4. Mecanismo de reacción de la AAO

Mientras que algunas oxidasas oxidan alcoholes fenólicos (como la vainillil-alcohol oxidasa), todos los miembros de la familia GMC oxidan alcoholes no fenólicos. La similitudes estructurales y catalíticas sugieren que los miembros de esta familia podrían tener un mismo mecanismo enzimático de oxidación (Cavener, 1992), entre los comentados en el apartado 2.2 de la introducción (ver Fig. 6). Para la metanol oxidasa fue propuesto inicialmente un mecanismo de formación de radicales (Sherry y

Abeles, 1985; Silverman *et al.*, 1980). Sin embargo, existen autores que no descartan un mecanismo de transferencia directa de un hidruro (Geissler *et al.*, 1986; Menon *et al.*, 1995; Mincey *et al.*, 1980).

En la glucosa oxidasa y la colesterol oxidasa los mecanismo de oxidación propuestos conllevan la participación de un residuo de la enzima como base activa. De esta manera en la reacción de reducción de la enzima, dos electrones y un protón son transferidos a la flavina y el otro protón a dicha base. Para ambas enzimas el resultado global es el mismo, pero con algunas diferencias en el transcurso de sus reacciones de oxidación de los sustratos. Para la glucosa oxidasa están propuestos dos posibles mecanismos: i) transferencia directa de un hidruro al N5 de la flavina desde el C1 del sustrato; y ii) mecanismo carboaniónico con la unión nucleofílica del 1-OH de la D-glucosa al C4a de la flavina seguida de la abstracción de un protón desde el C-1 del sustrato (Bright y Appleby, 1969; Gibson *et al.*, 1964; Su y Klinman, 1999). En la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa el 1-OH de la D-glucosa se sitúa a una distancia de 2,8 Å de H516 y H559, siendo posible la transferencia de un protón desde el sustrato a cualquiera de estos residuos. Como ya se ha mencionado anteriormente, los resultados de mutagénesis dirigida realizados por Witt *et al.* (2000) corroboraron la implicación de estas histidinas en el mecanismos de oxidación de la glucosa.

En el caso de la colesterol oxidasa las interacciones entre la enzima y el sustrato (complejo colesterol oxidasa/D-hidroisoandrosterona) permiten proponer: i) un mecanismo de transferencia directa de un hidruro semejante al de la glucosa oxidasa; o ii) la formación de un radical similar al propuesto para la metanol oxidasa (Li *et al.*, 1993). Para ambos mecanismos las distancias entre el 1OH del sustrato y H557 (base activa) imposibilitan una transferencia directa desde el sustrato a la base, pudiendo estar mediada por una molécula de agua. Cuando se forma el complejo entre la colesterol oxidasa y el sustrato tan sólo permanece una molécula de agua (H_2O^{541}) en el sitio de unión a los sustratos. Antes de la unión del sustrato esta molécula estaba unida mediante puentes de hidrógeno a N485, H447 y al N5 del anillo de flavina. Tras la unión al sustrato estas uniones permanecen y se origina un nuevo puente de hidrógeno entre H_2O^{541} y el O1 del sustrato. Por lo tanto la protonación de la H557 de la colesterol oxidasa podría ser a través de esta molécula de agua, y no de manera directa como ocurre en la glucosa oxidasa.

Se ha propuesto el mecanismo de transferencia de un hidruro como un mecanismo consenso en las miembros de la familia GMC. Este tipo de

mecanismo de deshidrogenación es para algunos autores (Mattevi *et al.*, 1997b) el más frecuentemente empleado por las flavoenzimas. Con la resolución de las estructuras cristalográficas y estudios de mutagénesis dirigida se ha probado este tipo de mecanismo como alternativo a los otros que tradicionalmente habían sido propuestos (Ghisla y Massey, 1989; Karplus y Schulz, 1989; Mattevi *et al.*, 1997b).

Atendiendo a lo anteriormente comentado, y a la información sobre la AAO obtenida del *docking* con distintos alcoholes y de los estudios de mutagénesis dirigida, se puede proponer para la oxidación de los diferentes alcoholes por la AAO un mecanismo de transferencia de un hidruro mediado por una base. En el *docking* con los alcoholes veratrílico y cinamílico se observaron dos posibles orientaciones que favorecerían un mecanismo de oxidación por transferencia de un hidruro. En la primera el grupo 1OH se sitúa a una distancia de 3.5 Å del N5 a la de flavina pero a distancias mayores de 5 Å de los residuos H502 y H546, por lo que la transferencia de un protón debería de estar mediada por un mecanismo del tipo descrito para la colesterol oxidasa. En la segunda posible orientación el 1OH del alcohol veratrílico o cinamílico es equidistante y a distancia de

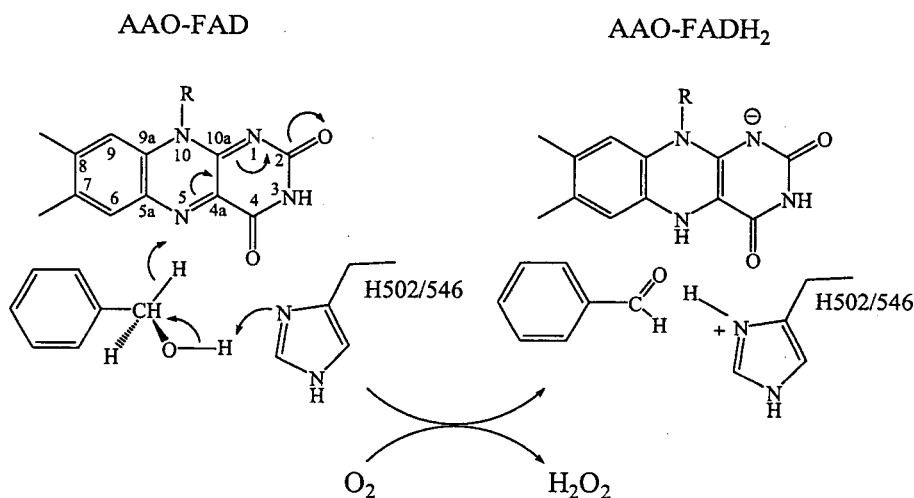


Figura 40. Ciclo catalítico de la AAO. Se describe el posible mecanismo de oxidación del alcohol bencílico a benzaldehído por transferencia de un hidruro mediado por una base en la reacción de reducción de la enzima, y la oxidación de la AAO por el O₂ formando H₂O₂.

punto de hidrogeno de H502 y H546 pudiéndose darse la protonación directa de éstas. La abstracción de un protón desde el OH del C1 de los sustratos de la AAO a una de las bases (H502 y/o H546) facilitaría la transferencia directa de un hidruro a la flavina.

Para concluir, la Fig. 40 resume el ciclo catalítico de la AAO de *P. eryngii* dividido en dos reacciones. En la reacción de reducción, la AAO catalizaría la oxidación y deshidrogenación de alcoholes aromáticos o alifáticos poliinsaturados mediante un mecanismo de transferencia de un hidruro desde el C_{α} mediado por una base. De esta forma dos electrones y un protón serían transferidos al cofactor y el otro protón a uno de los residuos de histidina (H502 y/o H546) propuestos como bases activas. El ciclo catalítico de la AAO se completa con la reoxidación de la enzima al transferir los dos protones y los dos electrones al O_2 para generar H_2O_2 .

Conclusiones

1. La expresión heteróloga del cDNA de la AAO de *P. eryngii* en *E. nidulans* y *E. coli* (en el segundo caso seguida de activación *in vitro*) ha permitido completar la caracterización de esta flavoenzima (iniciada con el estudio de la forma salvaje). Con este fin se utilizaron técnicas de *stopped-flow* y mutagénesis dirigida entre otras.
2. La AAO de *P. eryngii* es una oxidasa atípica ya que no estabiliza un intermediario de tipo semiquinona aniónica (durante su reducción por sustratos, ditionito o fotorreducción) ni forma un aducto con el sulfito. Estos hechos resultan llamativos al existir un residuo con carga positiva en las inmediaciones del C4a de la flavina.
3. Los sustratos típicos de la AAO son alcoholes aromáticos o alifáticos poliinsaturados con un hidroxilo primario en el C $_{\alpha}$. Los alcoholes *p*-anisílico (5235 s $^{-1}$ mM $^{-1}$) y 3-cloro-*p*-anisílico (4086 s $^{-1}$ mM $^{-1}$) y el hexadienol (1271 s $^{-1}$ mM $^{-1}$) están entre los mejores sustratos, no detectándose un claro efecto electrónico al comparar diferentes sustituyentes en el anillo bencénico.
4. El centro activo de la AAO posee afinidad por compuestos con sistemas de dobles enlaces conjugados, con independencia de que contengan grupos hidroxilo alcohólicos, como han puesto de manifiesto estudios de inhibición.
5. La AAO sólo está implicada en reacciones de oxidación (de alcoholes y aldehídos) pero es incapaz de catalizar reacciones de desmetilación, desaminación e hidroxilación descritas para otras oxidasas de alcoholes aromáticos.
6. La AAO posee también actividad aldehído oxidasa que fue puesta de manifiesto en estudios de *stopped flow* (donde se vio que era lentamente reducida por los aldehídos generados por la propia enzima) y mediante ^{19}F NMR.
7. Los estudios de *stopped flow* con alcoholes bencílicos sustituidos mostraron la dependencia de las cinéticas de reducción de la AAO del tipo sustrato, calculándose las constantes de reducción (k_2 303 s $^{-1}$) y disociación (k_d 34 μM) para el alcohol *p*-anisílico.
8. La comparación de la estructura primaria de la AAO con la de la glucosa oxidasa y otros miembros de la familia GMC de oxidorreductasas, reveló la existencia de cuatro motivos conservados.

9. Este hecho, junto con la existencia de una topología típica con un dominio de unión del FAD (con el motivo $\beta\alpha\beta$) y un dominio de unión de sustratos, han llevado en este trabajo a considerar a la AAO como un nuevo miembro de la familia GMC de oxido-reductasas.
10. Mediante acoplamiento molecular de la AAO con distintos sustratos se pudo localizar un bolsillo de unión de los sustratos en las inmediaciones del anillo de flavina. Posteriores estudios de mutagenesis dirigida confirmaron el papel de residuos del centro activo en la actividad catalítica.
11. Estos últimos estudios mostraron la necesidad de un residuo aromático en las posiciones ocupadas por Y92 y F501. Las constantes cinéticas de las variantes obtenidas sugieren que ambos residuos podrían modular el potencial redox del FAD de la AAO, y que Y92 podría también contribuir a la adecuada orientación de los sustratos.
12. Simultáneamente se mostró que dos histidinas próximas al N5 de la flavina (H502 y H546) y al hidroxilo alcohólico del sustrato, son indispensables para la actividad catalítica.
13. Se propone que estas dos histidinas actuarían como bases activas en la reacción de oxidación de los sustratos, a través de un mecanismo de deshidrogenación por transferencia directa de un hidruro y reducción del FAD.
14. Los estudios futuros sobre el mecanismo catalítico y la unión de los diferentes sustratos de esta interesante oxidasa se verán facilitados por la resolución de su estructura cristalográfica llevada a cabo muy recientemente en el CIB.

Bibliografía

- Adler, E. (1977) Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11: 169-218.
- Albrecht, M. y Lengauer, T. (2003) Pyranose oxidase identified as a member of the GMC oxidoreductase family. *Bioinformatics* 19: 1216-1220.
- Ander, P. y Marzullo, L. (1997) Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53: 115-131.
- Asada, Y., Watanabe, A., Ohtsu, Y. y Kuwahara, M. (1995) Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1339-1341.
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T. y Nilsson, T. (1993) Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. *Holzforschung* 47: 181-187.
- Bao, W.L., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A. y Hammel, K.E. (1994) Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.* 354: 297-300.
- Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., Escaso, V., Guillén, F., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1998) Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 325-332.
- Betts, W.B., Dart, R.K., Ball, A.S. y Pedlar, S.L. (1991) Biosynthesis and structure of lignocellulose. In: *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. (Ed.: Betts, W.B.), Springer-Verlag, London, pp. 139-155.
- Binda, C., Coda, A., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P. y Mattevi, A. (1999) A 30 Å-long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure. Fold. Des.* 7: 265-276.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* 255: 445-450.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-

- (3- ethylbenzothiazoline-6-sulphonate). Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 823-827.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bright, H.J. y Appleby, M. (1969) The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction. J. Biol. Chem. 244: 3625-3634.
- Bruckmann, M., Termonia, A., Pasteels, J.M. y Hartmann, T. (2002) Characterization of an extracellular salicyl alcohol oxidase from larval defensive secretions of *Chrysomela populi* and *Phratora vitellinae* (Chrysomelina). Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 1517-1523.
- Camarero, S., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1997) Lignin-degrading enzymes produced by *Pleurotus* species during solid-state fermentation of wheat straw. In: Advances in Solid State Fermentation. (Eds.: Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. y Viniegra-González, G.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 335-345.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999) Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. J. Biol. Chem. 274: 10324-10330.
- Cavener, D.R. (1992) GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. J. Mol. Biol. 223: 811-814.
- Chapman, S.K. and Reid, G.A. (1999) Flavoprotein protocols. Humana Press, Totowa, USA.
- Crawford, R.L. (1981) Lignin Biodegradation and Transformation. Wiley Interscience, New York.
- de Jong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A. y de Bont, J.A.M. (1994) Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. Appl. Environ. Microbiol. 60: 271-277.
- de Jong, E., van Berkel, W.J.H., van der Zwan, R.P. y de Bont, J.A.M. (1992) Purification and characterization of vanillyl alcohol oxidase

- from *Penicillium simplicissimum*. A novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. Eur. J. Biochem. 208: 651-657.
- De Sa, R.J. (1972) Putrescine oxidase from *Micrococcus rubens*. Purification and properties of the enzyme. J. Biol. Chem. 247: 5527-5534.
- Decker, K. (1991) Covalent flavoproteins. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. (Ed.: Müller, F.), CRC Press, pp. 343-346.
- del Río, J.C., Gutiérrez, A. y Martínez, A.T. (2004) Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using pyrolysis-has chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. (in press):
- Deobald, L.A. y Crawford, D.L. (1989) Lignin biotransformation by an aromatic aldehyde oxidase produced by *Streptomyces viridosporus* T7A. Appl. Biochem. Biotechnol. 20/21: 153-163.
- Donaldson, L.A. (2001) Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. Phytochemistry 57: 859-873.
- Dostert, P. y Strolin, B.M. (1991) Structure-modulated recognition of substrates and inhibitors by monoamine oxidases A and B. Biochem. Soc Trans. 19: 207-211.
- Dreveny, I., Gruber, K., Glieder, A., Thompson, A. y Krastky, C. (2001) The hydroxynitrile lyase from almond: A lyase that looks like a oxidoreductase. Structure 9: 803-815.
- Drijfhout, F.P., Fraaije, M.W., Jongejan, H., van Berkel, W.J.H. y Franssen, M.R.C. (1998) Enantioselective hydroxylation of 4-alkylphenols by vanillyl alcohol oxidase. Biotechnol. Bioeng. 59: 171-177.
- Edmondson, D.E. (1995) Structure activity studies of the substrate binding site in monoamine oxidase B. Biochimie 77: 643-650.
- Entsch, B. y van Berkel, W.J. (1995) Structure and mechanism of *para*-hydroxybenzoate hydroxylase. FASEB J. 9: 476-483.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. FEMS Microbiol. Rev. 13: 235-240.

- Faison, B.D. y Kirk, T.K. (1983) Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1140-1145.
- Farmer, V.C., Henderson, M.E.K. y Russell, J.D. (1960) Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. Biochem. J. 74: 257-262.
- Fengel, D. and Wegener, G. (1984) Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. De Gruyter, Berlin.
- Fergus, B.J. y Goring, D.A.I. (1970) The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. Holzforschung 24: 118-124.
- Fernández-Cañón, J.M. y Peñalva, M.A. (1995) Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 246: 110-118.
- Ferreira, P., Guillén, F., Ruiz-Dueñas, F.J., García de Lacoba, M., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2002) Structure-function studies on fungal aryl-alcohol oxidase. In: Flavins and flavoproteins. (Eds.: Chapman, S.K., Perham, R.N. y Scrutton, N.S.), Rudolf Weber, Berlin, pp. 155-160.
- Fitzpatrick, P.F. y Massey, V. (1982) The kinetic mechanism of D-amino acid oxidase with D- α -aminobutyrate as substrate. Effect of enzyme concentration on the kinetics. J. Biol. Chem. 257: 12916-12923.
- Fraaije, M.W. y Mattevi, A. (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. Trends in Biochemical Science 25: 126-132.
- Fraaije, M.W. y van Berkel, W.J.H. (1997) Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. J. Biol. Chem. 272: 18111-18116.
- Fraaije, M.W., van Berkel, W.J.H., Benen, J.A.E., Visser, J. y Mattevi, A. (1998a) A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain. Trends in Biochemical Science 23: 206-207.

- Fraaije, M.W., van den Heuvel, R.H., van Berkel, W.J. y Mattevi, A. (1999) Covalent flavinylation is essential for efficient redox catalysis in vanillyl-alcohol oxidase. *J. Biol. Chem.* 274: 35514-35520.
- Fraaije, M.W., van den Heuvel, R.H.H., Roelofs, J.C.A.A. y van Berkel, W.J.H. (1998b) Kinetic mechanism of vanillyl-alcohol oxidase with short-chain 4-alkylphenols. *Eur. J. Biochem.* 253: 712-719.
- Fraaije, M.W., Veeger, C. y van Berkel, W.J.H. (1995) Substrate specificity of flavin-dependent vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. Evidence for the production of 4-hydroxycinnamyl alcohols from allylphenols. *Eur. J. Biochem.* 234: 271-277.
- Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, R.S., Masiarz, F., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S., Chakraborty, S., Schopfer, L.M. y Massey, V. (1990) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* 265: 3793-3802.
- Friesner, R.A. y Beachy, M.D. (1998) Quantum mechanical calculations on biological systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 257-262.
- Gassner, G.T., Ludwig, M.L., Gatti, D.L., Correll, C.C. y Ballou, D.P. (1995) Structure and mechanism of the iron-sulfur flavoprotein phthalate dioxygenase reductase. *FASEB J.* 9: 1411-1418.
- Geissler, J., Ghisla, S. y Kroneck, P.M. (1986) Flavin-dependent alcohol oxidase from yeast. Studies on the catalytic mechanism and inactivation during turnover. *Eur. J. Biochem.* 160: 93-100.
- Ghisla, S. y Massey, V. (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* 181: 1-17.
- Gibson, Q.H., Swoboda, B.E. y Massey, V. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-3934.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. y Gold, M.H. (1983) An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 1077-1083.

- Goetghebeur, M., Nicolas, M., Brun, S. y Galzy, P. (1992) Production and excretion of benzyl alcohol oxidase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 31: 413-416.
- Guillén, F. (1991) Aril-Alcohol Oxidasa de *Pleurotus eryngii*. Estudio en Relación con la Degradación de la Lignina. Thesis, Univ. Alcalá de Henares, Madrid.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 142-147.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1988) Detección de una alcohol oxidasa extracelular, productora de peróxido de hidrógeno, en *Pleurotus eryngii*. Abs. 2nd. Spanish Conf. Biotechnol. ,Barcelona388
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 465-469.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 209: 603-611.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 465-470.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Gutiérrez, A. y Martínez, A.T. (1996) Biodegradación de la lignina: Una perspectiva actual. *Rev. Iberoam. Micol.* 13: 18-23.

- Hallberg, B.M., Henriksson, G., Pettersson, G. y Divne, C. (2002) Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 315: 421-434.
- Hammel, K.E. (1997) Fungal degradation of lignin. In: *Plant Litter Quality and Decomposition*. (Eds.: Cadisch, G. y Giller, K.E.), CAB International, London, pp. 33-45.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hartmann, C. y Klinman, J.P. (1991) Structure-function studies of substrate oxidation by bovine serum amine oxidase: relationship to cofactor structure and mechanism. *Biochemistry* 30: 4605-4611.
- Hayashi, S. y Nakamura, S. (1976) Comparison of fungal glucose oxidases. Chemical, physicochemical and immunological studies. *Biochim. Biophys. Acta* 438: 37-48.
- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. y Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229: 153-172.
- Higuchi, T. (1990) Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63.
- Higuchi, T. (1997) *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*. Springer Verlag, London.
- Hopkins, T.R. (1985) A multipurpose enzyme sensor based on alcohol oxidase. *Biotechnol. Lab.* December: 20-25.
- Husain, M., Edmondson, D.E. y Singer, T.P. (1982) Kinetic studies on the catalytic mechanism of liver monoamine oxidase. *Biochemistry* 21: 595-600.
- Iverson, T.M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. y Rees, D.C. (1999) Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* 284: 1961-1966.
- Jerpseth, B., Callahan, M. y Greener, A. (1997) *Stratagene-Strategies* 10: 37-38.

- Jorns, M.S. (1979) Mechanism of catalysis by the flavoenzyme oxynitrilase. *J. Biol. Chem.* 254: 12145-12152.
- Käärik, A. (1965) The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Stud. For. Suec.* 31: 3-81.
- Kalisz, H.M., Hendle, J. y Schmid, R.D. (1990) Purification of the glycoprotein glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 521: 245-250.
- Karhunen, P., Rummakko, P., Sipila, J., Brunow, G. y Kilpeläinen, I. (1995) The formation of dibenzodioxocin structures by oxidative coupling. A model reaction for lignin biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 36: 4501-4504.
- Karplus, P.A., Daniels, M.J. y Herriott, J.R. (1991) Atomic structure of ferredoxin-NADP+ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 251: 60-66.
- Karplus, P.A. y Schulz, G.E. (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 210: 163-180.
- Kass, I.J. y Sampson, N.S. (1998) Evaluation of the role of His447 in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Biochemistry* 37: 17990-18000.
- Kawai, S., Umezawa, T. y Higuchi, T. (1987a) *p*-Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β -O-4 lignin model compounds by *Coriolus versicolor* and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 210: 61-65.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N. y Haraguchi, T. (1987b) C_{α} - C_{β} cleavage of phenolic β -1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi* 33: 792-797.
- Kelley, R.L. y Reddy, C.A. (1986) Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 144: 248-253.

- Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 169: 2195-2201.
- Kiess, M., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (1998) Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. Eur. J. Biochem. 252: 90-99.
- Kim, K.K., Fravel, D.R. y Papavizas, G.C. (1990) Production, purification and properties of glucose oxidase from the biocontrol fungus *Talaromyces flavus*. Can. J. Microbiol. 36: 199-205.
- Kim, S.J., Suzuki, N., Uematsu, Y. y Shoda, M. (2001) Characterization of aryl alcohol oxidase produced by dye-decolorizing fungus, *Geotrichum candidum* Dec1. J. Biosci. Bioeng. 91: 166-172.
- Kirk, T.K. y Cullen, D. (1998) Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. (Eds.: Young, R.A. y Akhtar, M.), TAPPI Press, Atlanta, pp. 273-308.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41: 465-505.
- Koenigs, J.W. (1974) Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. Arch. Microbiol. 99: 129-145.
- Kusai, K., Sekuzu, I., Hagihara, B., Okunuki, K., Yamauchi, S. y Nakai, M. (1960) Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Biochim. Biophys. Acta 40: 555-557.
- Kutchan, T.M. y Dittrich, H. (1995) Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. J. Biol. Chem. 270: 24475-24481.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Large, A.T. y Connock, M.J. (1993) Aromatic alcohol oxidase and aldehyde oxidase activities in the digestive gland of three species of terrestrial

- gastropod (*Helix aspersa*, *Ario ater* and *Limax flavus*). Comp. Biochem. Physiol. 104B: 489-491.
- Lederer, F., Belmouden, A. y Gondry, M. (1996) The chemical mechanism of flavoprotein-catalysed alpha-hydroxy acid dehydrogenation: a mutational analysis. Biochem. Soc. Trans. 24: 77-83.
- Li, B., Nagalla, S.R. y Renganathan, V. (1996) Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1329-1335.
- Li, J., Vrieling, A., Brick, P. y Blow, D.M. (1993) Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: Implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases. Biochemistry 32: 11507-11515.
- Lindqvist, Y. y Branden, C.I. (1989) The active site of spinach glycolate oxidase. J. Biol. Chem. 264: 3624-3628.
- Lockington, R.A., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C. y Davies, R.W. (1985) Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. Gene 33: 137-149.
- Lockridge, O., Massey, V. y Sullivan, P.A. (1972) Mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase. J. Biol. Chem. 247: 8097-8106.
- Lu, F. y Ralph, J. (2002) Preliminary evidence for sinapyl acetate as a lignin monomer in kenaf. Chem. Commun. (Camb.) 90-91.
- Ludwig, M.L. y Luschinsky, C.L. (1991) Structure and redox properties of clostridial flavodoxin. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. (Ed.: Müller, F.), CRC Press, pp. 427-466.
- Martínez, A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme Microb. Technol. 30: 425-444.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Ruel, K. y Pelayo, M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol. Rev. 13: 265-274.

- Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F. y Martínez, A.T. (1996) Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem. 237: 424-432.
- Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M.T. y Sannia, G. (1995) Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. J. Biol. Chem. 270: 3823-3827.
- Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. J. Biol. Chem. 269: 22459-22462.
- Massey, V. (1995) Introduction: flavoprotein structure and mechanism. FASEB J. 9: 473-475.
- Massey, V. y Hemmerich, P. (1977) A photochemical procedure for reduction of oxidation-reduction proteins employing deazariboflavin as catalyst. J. Biol. Chem. 252: 5612-5614.
- Massey, V. y Hemmerich, P. (1980) Active-site probes of flavoproteins. Biochem. Soc. Trans. 8: 246-257.
- Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, P.A., Howell, L.G., Mayhew, S.G., Matthews, R.G. y Foust, G.P. (1969a) The reactivity of flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity. J. Biol. Chem. 244: 3999-4006.
- Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G., Engel, P.C., Matthews, R.G., Schuman, M. y Sullivan, P.A. (1969b) The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36: 891-897.
- Mattevi, A. (1998) The PHBH fold: not only flavoenzymes. Biophys. Chem. 70: 217-222.
- Mattevi, A., Fraaije, M.W., Mozzarelli, A., Olivi, L., Coda, A. y van Berkel, W.J.H. (1997a) Crystal structures and inhibitor binding in the octameric flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase: The shape of the active-site cavity controls substrate specificity. Structure 5: 907-920.
- Mattevi, A., Tedeschi, G., Bacchella, L., Coda, A., Negri, A. y Ronchi, S. (1999) Structure of L-aspartate oxidase: implications for the succinate

- dehydrogenase/fumarate reductase oxidoreductase family. Structure. Fold. Des 7: 745-756.
- Mattevi, A., Vanoni, M.A. y Curti, B. (1997b) Structure of D-amino acid oxidase: new insights from an old enzyme. Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 804-810.
- Mattevi, A., Vanoni, M.A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. y Curti, B. (1996) Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7496-7501.
- Mayhew, S.G. (1978) The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. Eur. J. Biochem. 85: 535-547.
- Medina, M., Martínez-Julvez, M., Hurley, J.K., Tollin, G. y Gómez-Moreno, C. (1998) Involvement of glutamic acid 301 in the catalytic mechanism of ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* PCC 7119. Biochemistry 37: 2715-2728.
- Menon, V., Hsieh, C.T. y Fitzpatrick, P.F. (1995) Substituted alcohols as mechanistic probes of alcohol oxidase. Bioorg. Chem. 23: 42-53.
- Meyer, M., Wohlfahrt, G., Knäblein, J. y Schomburg, D. (1998) Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: A docking, molecular mechanics and quantum chemical study. J. Comp. -Aided Molec. Design 12: 425-440.
- Mincey, T., Tayrien, G., Mildvan, A.S. y Abeles, R.H. (1980) Presence of a flavin semiquinone in methanol oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 77: 7099-7101.
- Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C. y Miura, R. (1996) Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution. J. Biochem. 120: 14-17.
- Moonen, M.J.H., Rietjens, I.M.C.M. y van Berkel, W.J. (2001) ¹⁹F NMR study on the biological Baeyer-Villiger oxidation of acetophenones. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 35-42.

- Moran, G.R., Entsch, B., Palfey, B.A. y Ballou, D.P. (1996) Evidence for flavin movement in the function of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from studies of the mutant Arg220Lys. *Biochemistry* 35: 9278-9285.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. y Olson, A.J. (1998) Automated docking using Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comp. Chem.* 19: 1639-1662.
- Muheim, A., Leisola, M.S.A. y Schoemaker, H.E. (1990a) Aryl-alcohol oxidase and lignin peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *J. Biotechnol.* 13: 159-167.
- Muheim, A., Waldner, R., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1990b) An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 204-209.
- Müller, D. (1928) *Biochemica. Z.* 199: 136-170.
- Müller, F. (1987) Flavins: Chemistry and biochemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 3: 215-230.
- Müller, F. (1991) Free flavins: Synthesis, chemical and physical properties. In: *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. (Ed.: Müller, F.), CRC Press, Boca Raton, pp. 2-71.
- Nandigama, R.K. y Edmondson, D.E. (2000) Structure-activity relations in the oxidation of phenethylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase A. *Biochemistry* 39: 15258-15265.
- Narang, S.A. (1987) *Synthesis and Applications of DNA and RNA*. Academic Press,
- Nishida, A. y Eriksson, K.-E. (1987) Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9: 325-338.
- Pérez-Boada, M., Doyle, W.A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Smith, A.T. (2002) Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 518-524.
- Pollegioni, L., Blodig, W. y Ghisla, S. (1997) On the mechanism of D-amino acid oxidase. Structure/linear free energy correlations and

- deuterium kinetic isotope effects using substituted phenylglycines. J. Biol. Chem. 272: 4924-4934.
- Pollegioni, L., Fukui, K. y Massey, V. (1994) Studies on the kinetic mechanism of pig kidney D-amino acid oxidase by site-directed mutagenesis of tyrosine 224 and tyrosine 228. J. Biol. Chem. 269: 31666-31673.
- Pollegioni, L., Langkau, B., Tischer, W., Ghisla, S. y Pilone, M.S. (1993) Kinetic mechanism of D-amino acid oxidases from *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*. J. Biol. Chem. 268: 13850-13857.
- Regalado, V., Perestelo, F., Rodríguez, A., Carnicero, A., Sosa, F.J., de la Fuente, G. y Falcón, M.A. (1999) Activated oxygen species and two extracellular enzymes: Laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 388-390.
- Romero, E., Speranza, M., García-Guinea, J., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2003) Degradación de los discos compactos por hongos. Abs. SEM'2003 (19th Spanish Congr. Microbiol.) Santiago de Compostela, 21-25 Sept.
- Rotsaert, F.A.J., Renganathan, V. y Gold, M.H. (2003) Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemistry USA 42: 4049-4056.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martinez, MJ. y Martínez, A.T. (2004) *In vitro* activation and structural and kinetic characterization of recombinant fungal aryl-alcohol oxidase expressed in *Escherichia coli*. Manuscrito
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999a) Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn^{2+} and different aromatic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4705-4707.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999b) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Mol. Microbiol. 31: 223-236.

- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular cloning. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sannia, G., Limongi, P., Cocca, E., Buonocore, F., Nitti, G. y Giardina, P. (1991) Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Biochim. Biophys. Acta 1073: 114-119.
- Schoemaker, H.E. (1990) On the chemistry of lignin degradation. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas 109: 255-272.
- Schreuder, H.A., Prick, P.A., Wierenga, R.K., Vriend, G., Wilson, K.S., Hol, W.G.L. y Drenth, J. (1989) Crystal structure of the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 Å resolution. Analysis of the enzyme-substrate and enzyme-product complexes. J. Mol. Biol. 208: 679-696.
- Sherry, B. y Abeles, R.H. (1985) Mechanism of action of methanol oxidase, reconstitution of methanol oxidase with 5-deazaflavin, and inactivation of methanol oxidase by cyclopropanol. Biochemistry 24: 2594-2605.
- Silverman, R.B., Hoffman, S.J. y Catus, W.-B. (1980) A mechanism for mitochondrial monoamine oxidase catalyzed amine oxidation. J. Am. Chem. Soc 102: 7126-7128.
- Stenberg, K. y Lindqvist, Y. (1997) Three-dimensional structures of glycolate oxidase with bound active-site inhibitors. Protein Sci. 6: 1009-1015.
- Strickland, S., Palmer, G. y Massey, V. (1975) Determination of dissociation constants and specific rate constants of enzyme-substrate (or protein-ligand) interactions from rapid reaction kinetic data. J. Biol. Chem. 250: 4048-4052.
- Su, Q. y Klinman, J.P. (1999) Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the importance of electrostatic stabilization in superoxide formation. Biochemistry 38: 8572-8581.
- Swoboda, B.E. y Massey, V. (1965) Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. J. Biol. Chem. 240: 2209-2215.

- Tarentino, L.A. y Maley, F. (1974) Purification and properties of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. J. Biol. Chem. 249: 811-817.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19-26.
- Tien, M. y Kirk, T.K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science 221: 661-663.
- Valmaseda, M., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1991) Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* - Lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 817-823.
- van Beilen, J.B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R. y Witholt, B. (1992) DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*. Mol. Microbiol. 6: 3121-3136.
- van Berkel, W.J. y Muller F. (1991) Flavin-dependent monooxygenases with special reference to *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. (Ed.: Müller,F.), CRC Press,pp. 1-30.
- Varela, E., Böckle, B., Romero, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2000a) Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. BBA Protein Struct. Mol. Enzym. 1476: 129-138.
- Varela, E., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2001) Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. Biochim. Biophys. Acta 1546: 107-113.

- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.
- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000b) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Vrielink, A., Lloyd, L.F. y Blow, D.M. (1991) Crystal structure of cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 533-554.
- Walker, M.C. y Edmondson, D.E. (1994) Structure-activity relationships in the oxidation of benzylamine analogues by bovine liver mitochondrial monoamine oxidase B. *Biochemistry* 33: 7088-7098.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. y Bauer, J.C. (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151: 119-123.
- Wierenga, R.K., de Maeyer, M.C.H. y Hol, W.G.L. (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* 24: 1346-1357.
- Wierenga, R.K., Drenth, J. y Schulz, G.E. (1983) Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD - as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* 167: 725-739.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P. y Hol, W.G.L. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187: 101-107.
- Wilson, R. (1992) Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics* 7: 165-185.
- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (2000) Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Biochem. J.* 347: 553-559.

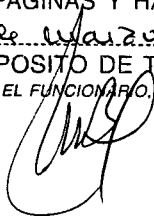
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. y Hecht, H.-J. (1999) 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasekiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. D* 55: 969-977.
- Xia, Z.X. y Mathews, F.S. (1990) Molecular structure of flavocytochrome b2 at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212: 837-863.
- Yoshimura, T. y Isemura, T. (1971a) Subunit structure of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *J. Biochem. (Tokyo)* 69: 839-846.
- Yoshimura, T. y Isemura, T. (1971b) The relation between quaternary structure and the binding of flavin-adenine dinucleotide in glucose oxidase. *J. Biochem. (Tokyo)* 69: 969-972.
- Yue, Q.K., Kass, I.J., Sampson, N.S. y Vrielink, A. (1999) Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry* 38: 4277-4286.
- Zabel, R. and Morrell, J. (1992) *Wood Microbiology: Decay and its Prevention*. Academic Press, London.



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
SERVICIO DE POSTGRADO

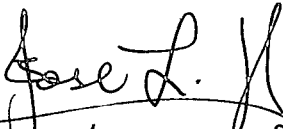
DILIGENCIA PARA HACER CONSTAR QUE EL
PRESENTE EJEMPLAR DE LA TESIS PRESENTADA
POR D.^a Patricia Ferreira Neila
CONSTA DE 123 PAGINAS Y HA SIDO ENTREGADA
CON FECHA 31 de mayo de 2004
A EFECTOS DE DEPOSITO DE TESIS.


EL FUNCIONARIO.



Reunido el Tribunal que suscribe en
el día de la fecha acordó otorgar
a la presente Tesis Doctoral la
calificación de Sobresaliente
"Cum laude" por unanimidad

Alcalá de Henares, 31 de mayo de 2004


José Luis Gopa Patino
Secretario del Tribunal

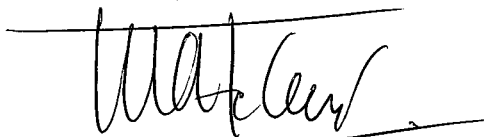

B. Saca Ter

Guillermo Rincón

Vocal



Vocal



Vocal: Miguel Angel Telea Senebuc